

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE TECNOLOGIA
ESCOLA DE QUÍMICA

MORGANA PEREIRA SOARES

HIDROGÊNIO BIOLÓGICO: MAPEAMENTO TECNOLÓGICO E PRODUÇÃO
EMPREGANDO SEMENTE DE AÇAÍ COMO MATÉRIA-PRIMA

RIO DE JANEIRO,

2020

MORGANA PEREIRA SOARES

**HIDROGÊNIO BIOLÓGICO: MAPEAMENTO TECNOLÓGICO E PRODUÇÃO
EMPREGANDO SEMENTE DE AÇAÍ COMO MATÉRIA-PRIMA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharelado em Engenharia Química.

Orientação:

D.Sc. Maria Antonieta P. Gimenes Couto.

D.Sc. Ayla Sant'Ana da Silva.

D.Sc. Suzana Borschiver.

RIO DE JANEIRO,

2020

Ficha Catalográfica

Soares, Morgana Pereira.

Hidrogênio biológico: mapeamento tecnológico e produção empregando semente de açaí como matéria-prima/ Morgana Pereira Soares. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2020. xiv, 114 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2020.

Orientadores: Maria Antonieta P. Gimenes Couto, Ayla Sant'Ana da Silva e Suzana Borschiver.

1. Açaí. 2. hidrogênio 3. fermentação. 4. produção biológica de hidrogênio 5. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 6. Maria Antonieta P. Gimenes Couto, Ayla Sant'Ana da Silva e Suzana Borschiver. I. Hidrogênio biológico: mapeamento tecnológico e produção empregando semente de açaí como matéria-prima.

MORGANA PEREIRA SOARES**HIDROGÊNIO BIOLÓGICO: MAPEAMENTO TECNOLÓGICO E PRODUÇÃO
EMPREGANDO SEMENTE DE AÇAÍ COMO MATÉRIA-PRIMA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharelado em Engenharia Química.

Rio de Janeiro, 07 de Dezembro de 2020.

Prof. Maria Antonieta P. Gimenes Couto, *D.Sc.* – UFRJ
Orientadora

Prof. Ayla Sant’Ana da Silva, *D.Sc.* – INT
Orientadora

Prof. Suzana Borschiver, *D.Sc.* – UFRJ
Orientadora

Prof. Élcio Ribeiro Borges, *D.Sc.* – UFRJ
Membro interno

Mariana de Oliveira Faber, *M.Sc.* – INT
Membro externo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carmen e Gilvan, que sempre priorizaram a minha educação e se sacrificaram para que eu pudesse ter acesso aos meios necessários para uma educação de qualidade. Agradeço o privilégio de poder sempre ter me dedicado exclusivamente aos estudos. Essa conquista é mais de vocês que minha. A toda minha família, meus primos (principalmente Thaiana e Renata que nunca desistiram da nossa viagem ao Canadá), tios e avós, que sempre acreditaram no meu potencial e nunca duvidaram que eu pudesse chegar aonde estou hoje. Aos meus sobrinhos, Juan e Julia, e à todas as minhas crianças, que me estimulam a ser sempre um exemplo melhor.

Ao Renato, por ter sido um companheiro incrível e muito compreensivo nesta reta final. Por ter me ajudado neste trabalho diretamente, com a edição das imagens, e indiretamente, me ajudando a seguir em frente e me mostrando que eu era capaz de lidar com todas as minhas obrigações.

Às minhas orientadoras Maria Antonieta e Suzana por terem aceitado a me ajudar com o trabalho e participar da orientação. À Ayla Sant'Ana pela vivência e por todos os ensinamentos durante os anos que passei no LABIC.

Aos meus amigos do LABIC que foram essenciais para a realização deste trabalho. Em especial ao Ricardo, pela ajuda na execução dos ensaios e pela companhia na bancada. Ao Felipe, Paulo Victor, Thiago, Alvaro e Gabriel pelos bons momentos e pelas risadas durante o almoço. A todos os membros do LABIC que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento e para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos de graduação que me acompanharam nessa trajetória. Thiago, Matheus, Thayane e Marcos, que iniciaram essa jornada comigo quando eu ainda era uma caloura perdida e confusa. Bruna, Gabriel Santos, Gabriel Bertassone, Leonardo, Milena, Luiza e Pedro Henrique, pelo carinho, pelas festas, pelas conversas e por tornarem a graduação menos árdua. Em especial ao Roberto e ao Aluan, pelo companheirismo de todos esses anos e por cada ajuda que me deram, sem vocês eu dificilmente conseguiria concluir esta etapa.

Aos meus amigos da vida que me ouviram e aconselharam nas crises, em especial a Isabella, Olga e Elaine, que são mulheres incríveis que me inspiram muito. Aos meus amigos da equipe de vendas da PROTEGO que me alegraram nesta reta final e torceram para que eu conseguisse finalizar mais esta etapa da vida.

Ao meu padrinho Marcelo *in memoriam*, por todo carinho e afeto que me deu desde criança. Sei que estaria muito feliz de compartilhar este momento comigo.

RESUMO

O açaí é um fruto que conquistou novos mercados nos últimos anos. Cerca de 85% da massa do fruto são compostos pela semente, gerando acúmulo de 1,47 milhão de toneladas de sementes em 2018. Encontrar aplicações para esses resíduos possibilita reduzir o impacto ambiental. Estudos mostraram que o principal componente da semente de açaí é a manana (~50%), polímero de manose, passível de fermentação por microrganismos anaeróbios, gerando hidrogênio (H₂), dentre outros produtos. H₂ é uma alternativa promissora às atuais fontes de energia, por ser sustentável e possuir grande potencial combustível. Esse trabalho teve como objetivo estudar as tendências tecnológicas da bioprodução de H₂ e avaliar a produção via fermentação escura através do uso do hidrolisado da semente de açaí (HSA) como fonte de carbono. Foi realizado um mapeamento tecnológico sobre a bioprodução de H₂, envolvendo a análise de artigos, obtidos através da base Scopus, e patentes, obtidos através da base USPTO. A maioria das tecnologias se encontra na fase inicial de desenvolvimento, sob estudo científico. Os documentos foram analisados sobre as classes Macro, Meso e Micro, afim de prever as tendências e o nível de desenvolvimento das tecnologias. O processo produtivo de hidrogênio foi amplamente explorado, sendo direcionado para otimização de processos nos estudos científicos e, para a biotecnologia nas patentes. As fermentações foram realizadas com o HSA obtido da hidrólise das sementes moídas com H₂SO₄ 3,0% (m/m) com a razão semente:ácido (m/v) de 1:4, por 60 min, à 121°C, recuperando o HSA por filtração. Ensaio contendo meio sintético (MS) mimetizando o HSA foram realizados para comparação. O lodo anaeróbio, utilizado como inóculo, foi termicamente tratado em duas condições: por 30 min a 65°C (condição mesofílica), e por 20 min a 95°C (condição termofílica). O meio fermentativo apresentava uma razão $DQO_{\text{substrato}}/SSV_{\text{inoculo}}$ de 0,25 (5,33gL⁻¹/21,33gL⁻¹) em volumes finais de 45 mL, para o ensaio de bancada, e 450 mL, para o ensaio de aumento de escala (*scale-up*). Os frascos foram purgados com N₂ e incubados a 35°C (condição mesofílica) ou 65°C (condição termofílica), e 150 rpm. Os ensaios com MS e concentração inicial de açúcares de 5gL⁻¹ apresentaram resultados mais atrativos para condições mesofílicas. As fermentações mesofílicas com HSA resultaram em maior rendimento em 24 h, atingindo 2,41 mol_{H₂}/mol_{carboidrato} e 2,62 mol_{H₂}/mol_{carboidrato} nos ensaios de bancada e *scale-up*, respectivamente.

Palavras-chave: Açaí, *Euterpe oleracea*, fermentação, hidrogênio, produção biológica de hidrogênio.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cachos de açaí em processo de maturação.	18
Figura 2. Esquema ilustrativo do corte transversal do açaí indicando as partes componentes.	22
Figura 3. Etapas da digestão anaeróbia realizada por consórcio microbiano para produção de hidrogênio. Para um processo efetivo, a fase da metanogênese deve ser inibida.	28
Figura 4. Via glicolítica da fermentação em fase escura.	29
Figura 5. Diagrama esquemático do reator UASB.	35
Figura 6. Etapas do processo biológico no reator ASBR.	36
Figura 7. Processo de obtenção do HSA: (a) produtos líquido e sólido da hidrólise após reação na autoclave; (b) resíduo sólido do processo após filtração.	73
Figura 8. Tratamento do lodo anaeróbio: (a) Concentração de sólidos do lodo em cone de sedimentação; (b) Sistema de pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio.	74
Figura 9: Esquema da metodologia adotada para realização da fermentação.	77
Figura 10. Meio fermentativo em frasco penicilina durante fermentação mesofílica ou termofílica de pequena escala.	78
Figura 11. Esquema do biorreator em batelada. Em I - Manômetro, II – Conexão T, III – Válvula de gás, IV – Válvula de líquido, V – Tubo de extensão da saída de líquido. ...	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição e quantificação das taxonomias da análise Meso dos artigos analisados no mapeamento tecnológico.	46
Tabela 2. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Processos dos artigos analisados no mapeamento tecnológico.	48
Tabela 3. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Insumos dos artigos analisados no mapeamento tecnológico.	50
Tabela 4. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Biotecnologia e Engenharia Bioquímica dos artigos analisados no mapeamento tecnológico.....	52
Tabela 5. Descrição e quantificação das taxonomias da análise Meso das patentes solicitadas analisadas no mapeamento tecnológico.....	59
Tabela 6. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Processos das patentes solicitadas analisadas do mapeamento tecnológico.....	60
Tabela 7. Descrição e quantificação das taxonomias da análise Meso das patentes concedidas analisadas no mapeamento tecnológico.....	66
Tabela 8. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Processos das patentes concedidas analisadas no mapeamento tecnológico.....	67
Tabela 9. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Insumos das patentes concedidas analisados no mapeamento tecnológico.....	69
Tabela 10. Composição de açúcares presentes nos meios sintéticos MS 1, MS 2 e MS 3.	77
Tabela 11. Caracterização do HSA 1 (lote 1), produzido no estudo de Leitão (2018), do HSA 2 (lote 1) e do HSA 3 (lote 3).	83
Tabela 12. Caracterização dos lodos anaeróbios L1, L2, L3 e L4.....	84
Tabela 13. Concentração e percentual de consumo de açúcares no meio fermentativo no início e após 24h de fermentação termofílica, utilizando MS 1 como fonte de carbono e com concentração inicial de açúcares de aproximadamente 3,0 gL ⁻¹	89

Tabela 14. Concentração de açúcares e percentual de consumo no meio fermentativo no início e após 24 h de fermentação mesofílica utilizando meio sintético MS 3 como fonte de carbono e com concentração inicial de açúcares de aproximadamente 5,0 gL ⁻¹	91
Tabela 15. Concentração e percentual de consumo dos açúcares presentes no meio fermentativo no início e após 24h de fermentação termofílica utilizando meio sintético MS 1 como fonte de carbono e com concentração inicial de açúcares de aproximadamente 5,0 gL ⁻¹	92
Tabela 16. Acompanhamento da concentração de açúcares e ácidos durante a fermentação mesofílica com meio sintético MS 2.	95
Tabela 17. Acompanhamento da concentração de açúcares e ácidos durante a fermentação termofílica com meio sintético MS 1.	97
Tabela 18. Concentração e percentual de consumo de açúcares no meio fermentativo no início e após 20h e 24h de fermentação utilizando HSA 1 como fonte de carbono.	100
Tabela 19. Rendimento e produtividade da produção de hidrogênio e dióxido de carbono com HSA 3 como fonte de carbono no ensaio de aumento de escala da fermentação mesofílica nos tempos 0 h, 17 h, 19 h, 21 h, 24 h e 45 h.	102
Tabela 20: Resumo dos resultados obtidos através dos ensaios experimentais.	104

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Produção anual de açaí no estado do Pará de 2000 a 2018.	20
Gráfico 2. Produção extrativista anual de açaí no Brasil e no estado do Pará de 2002 a 2018.	20
Gráfico 3. Quantidade de publicações de artigos por ano.	39
Gráfico 4. Distribuição percentual de publicações de artigos por área de conhecimento.	40
Gráfico 5. Distribuição percentual de artigos publicados em relação aos países de origem.	41
Gráfico 6. Distribuição percentual de artigos publicados por periódico.	42
Gráfico 7. Distribuição percentual de publicações de artigos por centros de pesquisa.	43
Gráfico 8. Distribuição percentual de artigos publicados pelas principais Universidades.	44
Gráfico 9. Distribuição percentual de artigos publicados pelos principais Institutos....	45
Gráfico 10. Distribuição de taxonomias da análise Meso em relação aos artigos utilizados para o mapeamento tecnológico.	47
Gráfico 11. Quantidade de patentes solicitadas por ano.	56
Gráfico 12. Distribuição percentual de patentes solicitadas em relação aos países de origem.	56
Gráfico 13. Distribuição percentual de patentes solicitadas por organização.	57
Gráfico 14. Distribuição percentual de patentes solicitadas de acordo com as empresas solicitantes.	58
Gráfico 15. Distribuição de taxonomias da análise Meso em relação às patentes solicitadas utilizadas para o mapeamento tecnológico.	59
Gráfico 16. Quantidade de patentes concedidas relacionadas à produção biológica de hidrogênio por ano.	61
Gráfico 17. Distribuição percentual de patentes concedidas em relação aos países de origem.	62

Gráfico 18. Distribuição percentual de patentes concedidas por tipo de solicitante.	63
Gráfico 19. Distribuição percentual de patentes concedidas de acordo com as Empresas solicitantes.	63
Gráfico 20. Distribuição de patentes concedidas de acordo com os Institutos.	64
Gráfico 21. Distribuição percentual de patentes concedidas de acordo com as Universidades.	65
Gráfico 22. Distribuição percentual de taxonomias da análise Meso em relação às patentes concedidas utilizadas para o mapeamento tecnológico.	66
Gráfico 23. Quantificação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido butírico e hidrogênio no início e após 24 h de fermentação mesofílica utilizando inóculo <i>in natura</i> ou termicamente tratado em condições mesofílicas.	86
Gráfico 24. Quantificação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido butírico e hidrogênio no início e após 24 h de fermentação mesofílica e termofílica com concentração inicial de açúcares de aproximadamente 3,0 gL ⁻¹	88
Gráfico 25. Quantificação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido butírico e hidrogênio no início e após 24 h de fermentação mesofílica e termofílica com concentração inicial de açúcares de aproximadamente 5,0 gL ⁻¹	90
Gráfico 26. Acompanhamento do consumo de açúcares e produção de hidrogênio e ácidos acético e butírico durante a fermentação mesofílica com meio sintético MS 2, composto por manose e glicose, como fonte de carbono.	94
Gráfico 27. Acompanhamento do consumo de açúcares e produção de hidrogênio e ácidos acético e butírico durante a fermentação termofílica com meio sintético MS 1 como fonte de carbono.	96
Gráfico 28. Quantificação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido butírico e hidrogênio no início e após 20 h e 24 h de fermentação mesofílica com HSA 1 como fonte de carbono.	99
Gráfico 29. Acompanhamento do rendimento e produtividade da produção de hidrogênio e dióxido de carbono com HSA 3 como fonte de carbono no ensaio de aumento de escala da fermentação mesofílica.	101

LISTA DE ABREVIATURAS

ABR	<i>Anaerobic baffled reactor</i>
ACK	acetato quinase
ADH	Álcool desidrogenase
AF	<i>Anaerobic filter reactor</i>
AFBR	<i>Anaerobic fluidized bed reactor</i>
ASBR	<i>Anaerobic sequential batch reactor</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CRIQ	<i>Centre De Recherche Industrielle du Quebec</i>
CSTR	<i>Continuous stirred-tank reactor</i>
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FHL	Formato-hidrogênio liase
HMF	Hidroximetilfurfural
HSA	Hidrolisado da semente de açaí
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MS	Meio sintético
NAFTA	<i>North American Free Trade Agreement</i>
PDH	Piruvato desidrogenase
PFL	Piruvato formato-liase
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket</i>
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	AÇAÍ.....	18
3.1.1	Características do fruto.....	18
3.1.2	Aspectos de produção e mercado.....	19
3.1.3	Aproveitamento de resíduo de açaí.....	21
3.2	HIDROGÊNIO.....	24
3.2.1	Métodos de produção de gás hidrogênio.....	25
3.2.2	Produção biológica de hidrogênio.....	26
3.2.3	Fermentação por bactérias anaeróbias.....	27
4	MAPEAMENTO TECNOLÓGICO.....	38
4.1	INTRODUÇÃO.....	38
4.2	ARTIGOS.....	38
4.2.1	Metodologia de pesquisa.....	38
4.2.2	Análise Macro.....	39
4.2.3	Análise Meso.....	46
4.2.4	Análise Micro.....	47
4.3	PATENTES.....	54
4.3.1	Metodologia de pesquisa.....	54
4.3.2	Patentes solicitadas.....	55
4.3.3	Patentes concedidas.....	61
4.4	CONSIDERAÇÕES GERAIS DO MAPEAMENTO.....	69
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	72

5.1	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	72
5.2	OBTENÇÃO DO HIDROLISADO DA SEMENTE DE AÇAÍ (HSA).....	72
5.3	PRÉ-TRATAMENTO TÉRMICO DO LODO ANAERÓBIO.....	73
5.3.1	Condição mesofílica.....	74
5.3.2	Condição termofílica.....	74
5.4	DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) E SÓLIDOS SUSPENSOS VOLÁTEIS (SSV).....	75
5.4.1	Demanda química de oxigênio (DQO).....	75
5.4.2	Sólidos Suspensos.....	76
5.5	FERMENTAÇÃO.....	76
5.5.1	Condição mesofílica.....	77
5.5.2	Condição termofílica.....	78
5.5.3	Aumento de escala da produção de hidrogênio (<i>scale-up</i>).....	78
5.6	ANÁLISE DAS AMOSTRAS ORIUNDAS DA FERMENTAÇÃO.....	80
5.7	CÁLCULO DAS VARIÁVEIS DE RESPOSTA DO PROCESSO.....	80
6	RESULTADOS.....	82
6.1	CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DA SEMENTE DE AÇAÍ (HSA) 82	
6.2	CARACTERIZAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO (INÓCULO).....	84
6.3	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM CONDIÇÕES MESOFÍLICAS E TERMOFÍLICAS DE FERMENTAÇÃO.....	85
6.3.1	Pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio.....	85
6.3.2	Comparação da produção de hidrogênio em condições mesofílicas e termofílicas variando a concentração inicial de açúcares.....	87
6.3.3	Acompanhamento do perfil cinético de fermentação para a produção de hidrogênio com meio sintético como fonte de carbono.....	93
6.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO MESOFÍLICA UTILIZANDO HSA COMO FONTE DE CARBONO.....	98

6.5	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO AUMENTO DE ESCALA NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO HSA.....	101
6.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
7	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	105
7.1	CONCLUSÕES	105
7.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	105
	REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart) é a palmeira que produz como fruto o açaí, muito presente no norte do Brasil. Os maiores consumidores de açaí no país são os estados do Rio de Janeiro e Pará, este último além de ser maior consumidor, é também o maior produtor de açaí. A comercialização do açaí tem crescido muito nos últimos anos, não só no Brasil, mas também na Europa, Japão e Estados Unidos, atingindo em 2018 uma produção equivalente a cerca de 1,73 milhão de toneladas de açaí (SEDAP, 2018).

Devido a programas governamentais de incentivo à produção de açaí, esse número tende a aumentar. Em 2016, o governo do Pará criou o Pró-Açaí (Programa de Desenvolvimento da Cadeia Produtiva do Açaí) que tem como objetivo implantar 50 mil hectares de açazeiros até 2020. Com o fim da implantação do programa, a estimativa é de introduzir cerca de 360 mil toneladas de açaí no mercado até 2024 (SEDAP, 2018).

É importante citar que apenas cerca de 15% da massa do fruto corresponde à sua parte comestível, que é comercializada (POMPEU, *et al.*, 2009 & PESSOA, *et al.*, 2010). A porção restante é composta pela semente do açaí, que atualmente é considerada um rejeito industrial e não possui um descarte adequado, gerando resíduo e causando grandes impactos ambientais. Considerando a produção de 2018, há uma estimativa de acúmulo de 1,47 milhão de toneladas de sementes por ano sem descarte apropriado.

Dessa forma, encontrar aplicações para o aproveitamento dessas sementes possibilitaria reduzir o acúmulo de resíduos, agregando valor à cadeia produtiva do açaí e beneficiando a economia e o desenvolvimento local.

Para definir novas aplicações, é importante ter conhecimento sobre a composição deste resíduo. Estudos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biocatálise do Instituto Nacional de Tecnologia mostraram que o principal carboidrato presente na semente do açaí é uma manana, polímero da manose, representando de 47,09% a 52,46% da massa total da semente (MONTEIRO, *et al.*, 2019). Manose é um açúcar que pode ser utilizado em processos fermentativos para a obtenção de um produto de alta densidade energética, como por exemplo, o gás hidrogênio (H₂).

As principais aplicações de hidrogênio atualmente são na indústria de fertilizantes e tratamento do petróleo bruto. Porém, o hidrogênio surge como uma alternativa de combustível sustentável, tendo como único subproduto de combustão a água, além de possuir alto potencial energético. O método biológico de produção de H₂ se destaca, pois possibilita uma cadeia produtiva sustentável. Neste sentido, processos fermentativos tem se destacado como alternativa para a produção de hidrogênio, devido à sua maior

produção, se comparada a outras rotas biológicas de produção, tais como biofotólise direta da água utilizando algas verdes e biofotólise indireta da água por cianobactérias (SÁ, *et al.*, 2014).

Consórcios microbianos de ocorrência natural, como os lodos de estações de tratamento de esgoto, podem ser utilizados na produção de hidrogênio por fermentação. Essa alternativa facilita o controle e a operação do processo, já que não há a necessidade de investimentos para evitar a contaminação do meio, reduzindo os custos do processo.

Além disso, a produção de hidrogênio a partir de resíduos industriais, utilizando uma cultura de microrganismos que não necessita de controle contra contaminação, permite vislumbrar a produção de hidrogênio em pequenas comunidades, descentralizando a produção de energia e movimentando a economia local. A adoção da produção biológica de hidrogênio via fermentação como mecanismo, associa-se à produção de um vetor energético promissor com a utilização de materiais residuais. Ou seja, além de produzir hidrogênio, propõe-se uma solução para o acúmulo de resíduo agroindustrial no meio ambiente.

A elaboração de um mapeamento tecnológico sobre a produção biológica de hidrogênio, possibilita a análise do nível de desenvolvimento das principais tecnologias que estão envolvidas. Com essa ferramenta, é possível avaliar os principais assuntos abordados, identificar possíveis gargalos envolvidos no assunto, que devem ser mais investigados, e analisar tendências, que podem ser relevantes para o desenvolvimento de outros trabalhos.

O presente trabalho foi organizado conforme descrição a seguir. O capítulo 1 contém uma breve contextualização do tema do trabalho, apontando sua importância e motivações. No capítulo 2 se encontram os objetivos gerais e específicos deste estudo. A fundamentação e o embasamento teórico utilizados durante a elaboração do trabalho são expostos no capítulo 3. No capítulo 4, encontra-se o mapeamento tecnológico, evidenciando as evoluções das tecnologias na produção biológica de hidrogênio. As metodologias dos ensaios experimentais realizados se encontram dispostas no capítulo 5, assim como os resultados e as discussões sobre estes experimentos são expostos no capítulo 6. No capítulo 7, tem-se os comentários finais e conclusão sobre os resultados e conhecimentos obtidos no estudo, além de incluir as sugestões para os próximos trabalhos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo o estudo das tendências tecnológicas da produção biológica de hidrogênio, e sua produção por fermentação utilizando o hidrolisado da semente do açaí (HSA) como fonte de carbono.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar um mapeamento tecnológico sobre a produção biológica de hidrogênio, expondo principais áreas de estudo e o nível de desenvolvimento de tecnologias;
- Avaliar a influência do pré-tratamento térmico do inóculo na produção de hidrogênio;
- Avaliar as produções mesofílica e termofílica de hidrogênio;
- Analisar comparativamente a produção de hidrogênio utilizando meio sintético e HSA como fonte de carbono;
- Analisar as interferências provocadas pelo aumento de escala na produção de hidrogênio;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AÇAÍ

Euterpe oleracea é uma palmeira nativa da Amazônia, que gera como fruto o açaí. O açaí é uma das espécies mais relevantes do gênero *Euterpe*, e é um importante componente da alimentação da população paraense, sendo consumido geralmente com farinha de mandioca, camarão, carne ou peixe (NOGUEIRA, *et al.*, 2005).

Em princípio, a importância do açazeiro se dava devido à produção de palmito (OLIVEIRA, *et al.*, 2007). Com o passar dos anos, e o advento da preocupação da sociedade com a saúde e estética, o açaí se tornou grande alvo de consumo devido às suas propriedades antioxidantes e seu alto teor energético (CONAB, 2019).

3.1.1 Características do fruto

O açaí (Figura 1) é um fruto de coloração roxa, que geralmente apresenta diâmetros entre 1 cm e 2 cm e possui aproximadamente 1,5 g de massa. O fruto é composto por um caroço volumoso e rígido encoberto por uma fina camada de polpa, e casca em sua parte externa. A polpa e a casca, que correspondem à parte comestível, compõem uma proporção muito pequena do fruto, enquanto o caroço representa a maior parte do fruto (POMPEU, *et al.*, 2009 & PESSOA, *et al.*, 2010).

Figura 1. Cachos de açaí em processo de maturação.



Fonte: EMBRAPA (2018).

As espécies encontradas mais frequentemente são *E. oleracea*, *E. precatória* e *E. edulis*, mas apenas as duas primeiras são utilizadas para comercialização do fruto. *E. precatória* é encontrada majoritariamente na região do Amazonas, por este motivo é conhecida como açáí-do-amazonas, sendo encontrada em terras de planície e planalto. Já a palmeira *E. oleracea* pode ser encontrada nos Estados do Pará, Maranhão, Tocantins e Amapá, sendo conhecida como açáí-do-pará e se encontra presente nas proximidades do Rio Amazonas (YAMAGUCHI, *et al.*, 2015).

O fruto se tornou assunto de estudo nos campos das indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos. Costa *et al.* (2013) relatou a existência de diversos estudos que comprovam os benefícios à saúde que o consumo de açáí acarreta. Dentre estes benefícios foram citados: prevenção contra doenças cardiovasculares e efeito anti-inflamatório e antialérgico. Os benefícios do açáí se dão devido à presença de substâncias bioativas na sua composição, como: fenólicos, flavonoides e antocianinas (COSTA, *et al.*, 2013).

3.1.2 Aspectos de produção e mercado

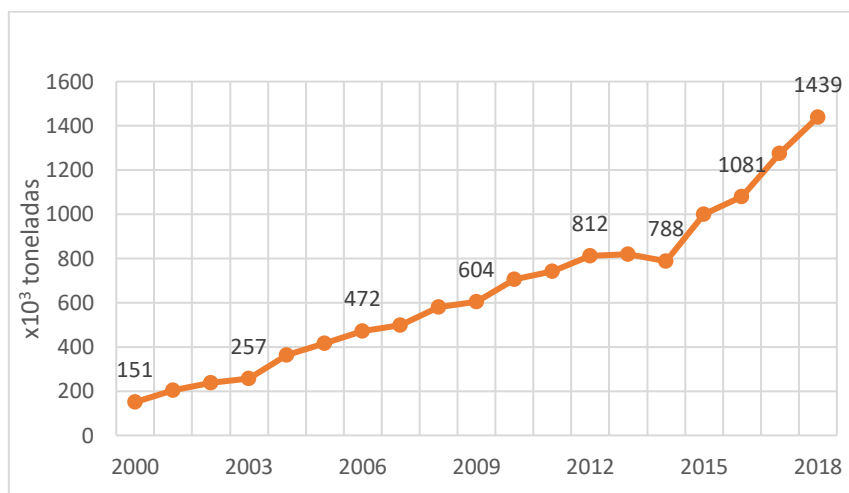
O açáí é um importante constituinte do extrativismo nacional, sendo responsável por aproximadamente 70% da renda dos extrativistas ribeirinhos do estado do Pará (LOPES & SANTANA, 2005 *apud* NOGUEIRA, DE SANTANA, *et al.*, 2013). Além do Pará, que é o maior produtor e consumidor de açáí, os Estados do Rio de Janeiro e São Paulo também requerem grandes quantidades de açáí para consumo. O fruto também começou a ser consumido internacionalmente e a ser exportado, principalmente, para os mercados do NAFTA, União Europeia e MERCOSUL (NOGUEIRA, *et al.*, 2013). O principal importador de açáí são os Estados Unidos, sendo o destino de cerca de 77% das importações (CONAB, 2019).

No ano de 2018, foram produzidas por cultivo aproximadamente 1,51 milhões de toneladas de açáí no país, 13% maior em relação ao ano anterior, sendo 1,44 milhões produzidos pelo estado do Pará, cerca de 95% da produção do país. Essa produção gerou por volta de 3,265 bilhões de reais no país inteiro e 199 mil hectares foram destinados a essa produção no mesmo ano (IBGE, 2018 & SEDAP, 2018).

O Gráfico 1 apresenta a produção total de açáí desde o ano 2000 até 2018 no estado do Pará, que é o responsável por grande parte da produção do país. Nota-se que a produção de açáí se manteve crescente pelo menos desde o ano 2000, apresentando

decrécimo apenas no ano de 2014, motivado por problemas climáticos na região (SEDAP, 2018).

Gráfico 1. Produção anual de açaí no estado do Pará de 2000 a 2018.

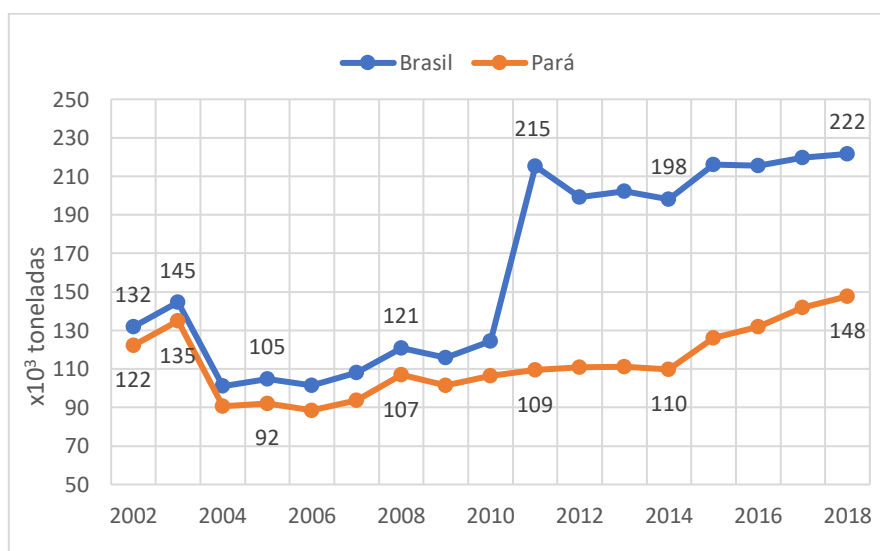


Fonte: IBGE - SEDAP, 2018. Elaboração: autora.

Em relação à produção extrativista, foram produzidas 222 mil toneladas de açaí no país no ano de 2018. Só o estado do Pará foi responsável por 148 mil toneladas, aproximadamente 67% do total. O valor de produção foi estimado em 592 milhões de reais no mesmo ano (IBGE, 2019).

O Gráfico 2 expõe a produção extrativista de açaí no Brasil e no estado do Pará entre os anos de 2002 e 2018.

Gráfico 2. Produção extrativista anual de açaí no Brasil e no estado do Pará de 2002 a 2018.



Fonte: IBGE – PAM, 2018. Elaboração: autora.

Até o ano de 2010, a produção de açaí no estado do Amazonas era desprezível, sendo origem de apenas cerca de 2% a 3% da produção do país. No ano seguinte, com os grandes avanços da produção de açaí no estado, o Amazonas foi capaz de aumentar sua produção de 3,3 mil toneladas em 2010 para 89,5 mil toneladas no ano de 2011. Esse cenário é perceptível no Gráfico 2, onde percebe-se o aumento abrupto da produção de 2010 para 2011. Neste mesmo período o estado do Pará aumentou sua produção somente em 2,6% (HERCULANO, 2013).

A produção extrativista no ano de 2018 representou 12,8% da produção total do país (cultivo + extrativismo, cerca de 1,73 milhão de toneladas) (IBGE, 2019).

Em 2016, o governo do estado do Pará apresentou um programa chamado Pró Açaí (Programa de Desenvolvimento da Cadeia Produtiva do Açaí no Estado do Pará), a fim de aumentar a produção de açaí no estado até o ano de 2024. O programa busca o desenvolvimento socioeconômico local e regional, ao mesmo tempo que visa assegurar a conservação ambiental. Dentre as ações destacadas no programa, estavam: implantar, manejar e enriquecer 50 mil hectares de açaizeiros, envolvendo em mais de 90% agricultores de base familiar (SEDAP, 2018).

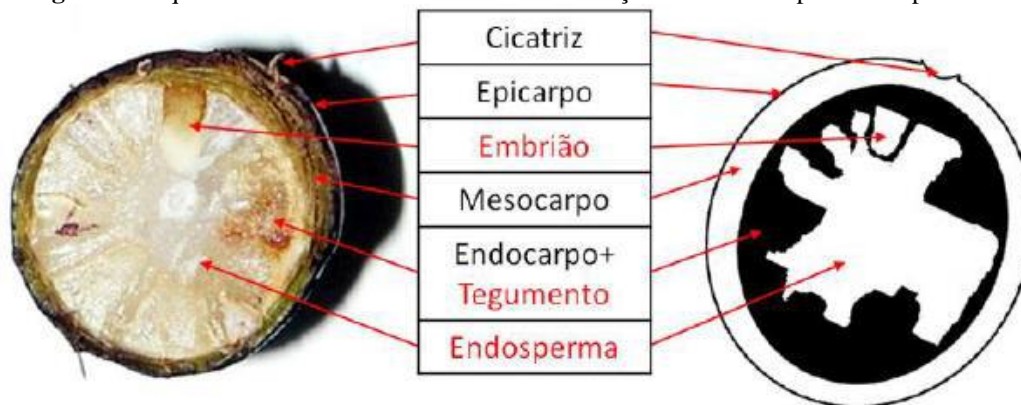
As ações descritas no programa foram definidas para serem realizadas entre os anos de 2016 e 2020. Com a efetivação do Programa em 2021, a produção é estimada em 72 mil toneladas de açaí, alcançando o seu ápice a partir de 2024 quando o cultivo chega ao sétimo ano de campo, colocando no mercado 360 mil toneladas a mais do fruto (SEDAP, 2018).

Considerando as projeções relacionadas ao projeto Pró Açaí e a produção crescente já mostrada anteriormente, pode-se afirmar que a tendência para os próximos anos é uma ascensão ainda maior da produção de açaí.

3.1.3 Aproveitamento de resíduo de açaí

Um importante ponto a ser mencionado é que o epicarpo e o mesocarpo do açaí, popularmente conhecidos como casca e polpa, são partes muito finas, apresentando apenas cerca de 1 a 2 mm de espessura (Figura 2). O fruto como um todo apresenta cerca de 1 a 2 cm de diâmetro (ROGEZ, 2000, *apud* LEITÃO, 2018, p. 21 & OLIVEIRA *et al.*, 2007). Considerando que apenas epicarpo e mesocarpo são as partes consumíveis do fruto, conclui-se que grande parte do fruto não é utilizada na cadeia produtiva do açaí.

Figura 2. Esquema ilustrativo do corte transversal do açaí indicando as partes componentes.



Fonte: LEITÃO (2018).

Estudos que avaliaram a composição do fruto relatam que a sua parte comestível, polpa e casca (mesocarpo + epicarpo), que é alvo de comercialização, representa apenas cerca de 5% a 15% da massa do açaí. A semente representa aproximadamente de 85% a 95% da massa do fruto (POMPEU, *et al.*, 2009 & PESSOA, *et al.*, 2010). Este componente não é alvo de comercialização, sendo quase sempre descartada sem controle e sem uma disposição adequada ao final do processo.

Assumindo a produção do ano de 2018, estimada em 1,73 milhão de toneladas, cerca de 1,47 milhão de toneladas de resíduo são gerados durante a produção de açaí anualmente. As sementes são comumente tratadas como lixo e descartadas, sem intenção de serem utilizadas com outra funcionalidade. Isso resulta em um importante problema urbano e ambiental causado pelo grande acúmulo de resíduo agroindustrial.

Sendo assim, seria interessante do ponto de vista ambiental e econômico encontrar novas formas de utilização desse rejeito de forma funcional. Assim, a semente de açaí poderia ser utilizada como matéria-prima de baixo custo, adicionando valor à cadeia produtiva, promovendo o desenvolvimento social local, e evitando o acúmulo de rejeitos no meio ambiente provenientes da produção.

Para atribuir uma nova funcionalidade às sementes e poder explorar de forma eficiente este material, é de extrema importância o conhecimento de sua composição. As biomassas lignocelulósicas são um importante grupo dentre os recursos renováveis, e sua composição geralmente é rica em celulose, lignina e hemicelulose (CHEN, *et al.*, 2017 & KUCHARSKA, *et al.*, 2018).

Em 2019, Monteiro e colaboradores caracterizam a semente de açaí, mostrando surpreendentemente que o componente em maior quantidade é a manana, um polímero da manose, representando de 47,09% a 52,46% da biomassa. Nas demais biomassas

lignocelulósicas, a manana geralmente está presente apenas em pequenas concentrações. Também foram identificadas glicose, xilose e galactose em menores quantidades na composição da biomassa, possivelmente derivados de outras hemiceluloses. As ligninas insolúveis representavam de 18,3% a 19,5% da biomassa.

Comumente são realizados processamentos nas biomassas a fim de tornar os constituintes internos mais disponíveis, rompendo barreiras químicas e físicas (JÖNSSON, MARTÍN, 2016). Tais processos podem alterar a macro e a microestrutura e a composição química da biomassa, promovendo separação, solubilização ou decomposição do complexo lignocelulósico (CHEN, *et al.*, 2017).

Algumas das principais metodologias para desestruturar a parede celular vegetal são: físicas, químicas, biológicas e combinações das demais. Os processos físicos buscam a fragmentação da biomassa, reduzindo o tamanho das partículas a fim de aumentar sua área de contato. Apesar de gerar pequenos impactos na poluição ambiental, o tratamento físico geralmente consome grande quantidade de energia e é utilizado na maioria das vezes como preparação da biomassa para um tratamento posterior. Os principais tratamentos físicos são: quebra mecânica, micro-ondas, ultrassônico e pirólise (CHEN, *et al.*, 2017 & KUCHARSKA, *et al.*, 2018). Os processos químicos buscam a decomposição da lignocelulose em componentes mais simples. Os principais processamentos químicos são: ácidos, que utilizam a hidrólise com ácidos diluídos como metodologia, é o tratamento mais aplicado na indústria, mas gera altos custos na construção dos reatores (JÖNSSON, MARTÍN, 2016 & KUCHARSKA, *et al.*, 2018); e básicos, que fazem uso da hidrólise básica, ou saponificação. Processos oxidativos e com líquido iônico são outros tratamentos químicos. Os processos biológicos se utilizam de microrganismos ou de enzimas produzidas por estes para decompor ou clivar as ligninas (CHEN, *et al.*, 2017 & KUCHARSKA, *et al.*, 2018).

Monteiro e colaboradores (2019) realizaram hidrólises da semente de açaí com ácidos em diferentes condições, e concluíram que a condição de hidrólise com ácido sulfúrico 4,5% (m/m), em autoclave a 121°C durante 60 min, foi a que apresentou maior rendimento em relação à recuperação de açúcares. Nessas condições foi possível recuperar cerca de 49,54% da manose contida na semente. Utilizando hidrólise enzimática combinada com a hidrólise ácida com H₂SO₄ 3% (m/m) foi possível atingir 96,8% de recuperação da manose presente na semente.

Visando a conciliar o desenvolvimento social e econômico regional com o desejo de atribuir uma funcionalidade para as sementes de açaí, ricas em manose e outros

açúcares, pode-se utilizá-las como fonte de carbono em processos fermentativos para produção de hidrogênio. Desta forma, seria possível realizar uma produção descentralizada de energia, favorecendo possíveis pequenos produtores regionais.

3.2 HIDROGÊNIO

O hidrogênio (H) é o elemento de menor massa atômica e mais abundante, presente em cerca de 90% do universo visível, e sendo encontrado principalmente como componente da água e de substâncias orgânicas. O gás hidrogênio (H₂) é caracterizado por ser extremamente inflamável, não-tóxico, sem cor e nem odor. Por não ser facilmente encontrado na natureza, é necessário desenvolver processos produtivos para sua obtenção (ABDIN, *et al.*, 2020 & DAWOOD, *et al.*, 2020)

O interesse pelo hidrogênio vem crescendo cada vez mais nos últimos anos. De acordo com Sazali (2020), a previsão de crescimento da demanda de hidrogênio nos próximos cinco anos é de 4% a 5%. Estima-se um crescimento do mercado de produção de hidrogênio de 115,25 bilhões de dólares em 2017 para 154,74 bilhões em 2022 (SAZALI, 2020).

As principais aplicações do hidrogênio atualmente são no refino do petróleo bruto, na produção de hidrocarbonetos no processo de Fischer-Tropsch e na indústria de fertilizantes durante a produção de amônia e ureia. Considerando o consumo no ano de 2017, 93% do hidrogênio na China foi destinado ao refino do petróleo, à produção de amônia e à síntese de metanol, que são os três maiores mercados do país (ABDIN, *et al.*, 2020). Entretanto, nos últimos anos vem crescendo o interesse no uso do hidrogênio como combustível sustentável alternativo às fontes de energia utilizadas atualmente.

Esse interesse se deve à necessidade de substituição dos combustíveis fósseis como fontes de energia, já que são recursos não-renováveis e que podem causar grandes consequências ambientais. Os combustíveis fósseis foram, por muitos anos, e ainda são utilizados como principal fonte de energia, porém sua ampla utilização gera grandes consequências ambientais. Durante sua combustão, essas substâncias liberam no ambiente gases de efeito estufa, como CO₂, causando também poluição do ar. Desta forma, é desejável que as novas fontes de energia sejam sustentáveis e não prejudiciais ao ambiente e à saúde da população (SÁ, *et al.*, 2014; WANG, YIN, 2019).

O hidrogênio vem ganhando bastante destaque como potencial nova fonte de energia. Isso se deve à sua utilização ser mais sustentável, visto que sua combustão gera

apenas água como produto (Equação 1), com exceção da pequena produção de NO_x se a combustão for realizada com ar, reduzindo a quase zero as emissões de gases prejudiciais ao meio ambiente (SAZALI, 2020).



Outras vantagens do uso de hidrogênio como combustível são: diversidade de matéria-prima para sua produção, incluindo fontes renováveis; versatilidade de aplicação em seu uso final; alta eficiência na conversão de energia; e maior capacidade calorífica que os combustíveis convencionais (SAZALI, 2020 & ABDIN, *et al.*, 2020). O hidrogênio possui uma densidade energética de aproximadamente 142 kJ/g considerada muito superior à de outros combustíveis como metano, gás natural, biodiesel e etanol, que apresentam respectivamente 55,7 kJ/g, 50 kJ/g, 37 kJ/g e 29,9 kJ/g (SÁ, *et al.*, 2014 & ELBESHISHY, *et al.*, 2017).

Devido ao seu caráter extremamente inflamável, deve ser seguido um protocolo rígido de segurança durante o transporte e armazenamento do gás hidrogênio, buscando evitar acidentes. É um gás que possui uma vasta faixa de inflamabilidade, de 4% a 72% em ar, temperatura de ignição relativamente baixa (400-571°C), e se dissipa facilmente no ar por ser menos denso que este. Essas características podem tornar o hidrogênio um importante gás a ser considerado como novo combustível, mas também exigem um maior cuidado com seu manuseio, devido à constante possibilidade de combustão descontrolada, principalmente em ambientes confinados. Essa questão dificulta a ampla utilização do hidrogênio como combustível, pois ainda existem gargalos para tornar os sistemas de transporte e armazenamento de hidrogênio mais seguros (DAWOOD, *et al.*, 2020).

3.2.1 Métodos de produção de gás hidrogênio

O método mais avançado para produção de hidrogênio é a quebra da molécula da água, sendo adotado majoritariamente sob a técnica da eletrólise. Porém, não é o método mais utilizado devido à alta demanda de energia para sua realização. Cerca de 40% do hidrogênio é produzido por reforma de gás natural, devido ao seu baixo custo e à infraestrutura facilitada. Entretanto, durante a produção ocorre a liberação de coprodutos como CO, que pode agravar o efeito estufa e NO_x em menores quantidades. Outros métodos também consolidados como oxidação parcial não-catalítica também requerem

consumo de energia e contrariam a sustentabilidade do uso do hidrogênio como combustível (SÁ, *et al.*, 2014; WANG, YIN, 2019; SAZALI, 2020 & ABDIN, *et al.*, 2020).

Considerando a busca pela fonte de energia renovável, é de extrema importância analisar a matéria-prima envolvida e que o processo produtivo do hidrogênio também seja sustentável, reduzindo ao máximo os danos ao meio ambiente.

Neste cenário, processos biológicos que são mais sustentáveis estão se tornando alvos de estudo na tentativa de tornar todo o processo mais verde. No geral, os processos biológicos apresentam rendimento menor e é necessário um maior controle de variáveis, incluindo o metabolismo de microrganismos (SAZALI, 2020). Esses pontos criam grande resistência por parte da indústria para adotar processos biológicos, sendo estes responsáveis por apenas 1% do hidrogênio produzido (SÁ, *et al.*, 2014). Assim, ainda são necessários estudos para aprimorar as técnicas e tornar o processo viável.

3.2.2 Produção biológica de hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio visa à produção de hidrogênio por via microbiana. Os principais métodos de produção biológica de hidrogênio são: biofotólise, fotofermentação, fermentação e combinações das anteriores. As duas primeiras técnicas requerem constante presença de luz e grandes áreas para captação da luz solar, para compensação do reduzido rendimento proporcionado.

Nesse contexto, a fermentação se torna bastante atrativa devido às seguintes características: não necessita da presença de luz, permitindo uma produção contínua; apresenta rendimento superior se comparado à algumas técnicas biológicas; não requer grandes áreas para produção; gera metabólitos de valor agregado como coprodutos, como ácidos orgânicos e álcoois que podem ser utilizadas como matéria-prima em outras aplicações, valorizando a cadeia produtiva; simplicidade de execução; e permite a utilização de biomassa proveniente resíduos industriais como matéria-prima. Esta última característica, além de proporcionar uma redução no acúmulo de rejeitos da indústria agrícola, também torna possível a obtenção de matéria-prima de baixo custo. Por fim, é possível utilizar consórcios microbianos naturalmente ocorrentes como inóculo, tornando o processo produtivo mais simples e reduzindo ainda mais os custos do processo, já que não é necessário desprender esforços para manter a assepsia do meio de cultivo. Todas essas medidas que visam à redução de custos e à simplicidade do método possibilitam a produção descentralizada de energia, tornando possível a produção de hidrogênio por

pequenos produtores distribuídos pelo país (SÁ, *et al.*, 2013; ELBESHBISHY, *et al.*, 2017; WANG, YIN, 2019 & ABDIN, *et al.*, 2020).

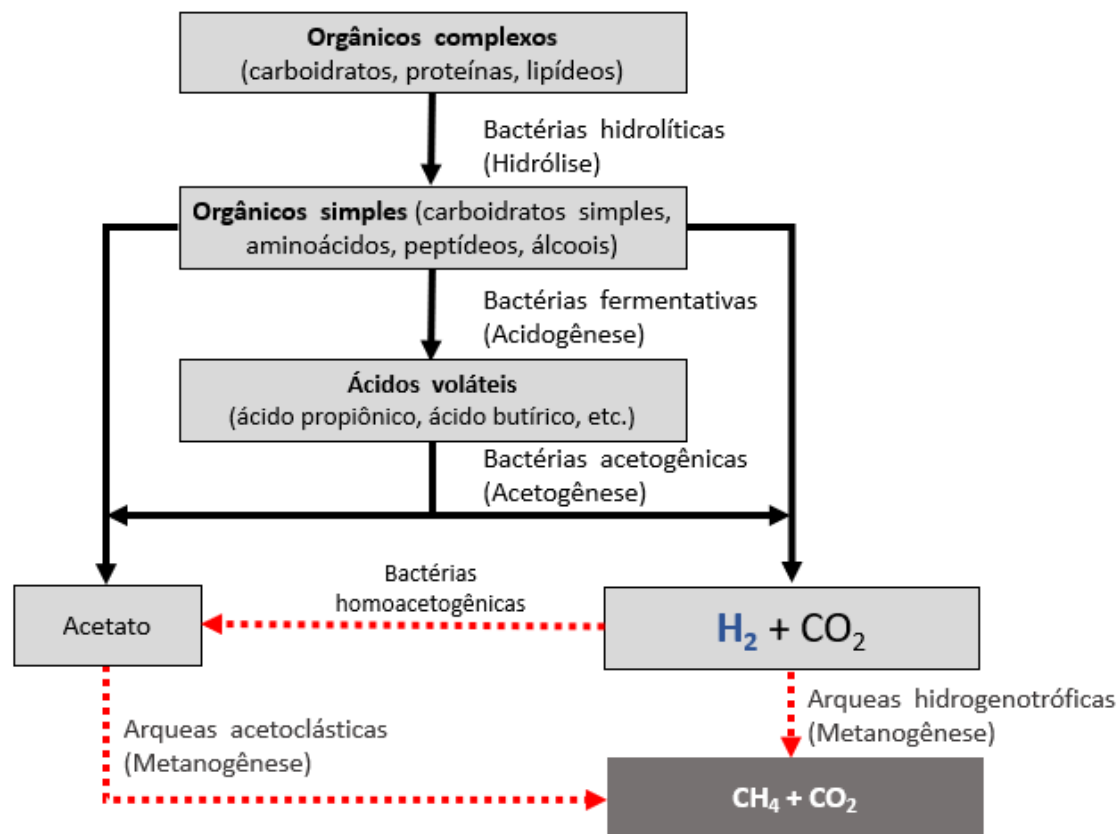
3.2.3 Fermentação por bactérias anaeróbias

A fermentação por bactérias anaeróbias ou fermentação em fase escura é o processo no qual microrganismos consomem carboidratos, proteínas ou lipídeos e produzem hidrogênio, CO₂, metano e ácidos orgânicos, como ácido butírico, acético e propiônico, ou álcoois, como etanol e butanol.

A fermentação acontece em quatro etapas consecutivas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 3). Quando o foco é a produção de hidrogênio a metanogênese deve ser inibida, já que nesta etapa há o consumo do hidrogênio produzido nas etapas anteriores para produção de metano.

Na hidrólise, os microrganismos hidrolíticos produzem enzimas que catalisam a degradação de matéria orgânica em moléculas simples, que podem ser transportadas através da membrana celular das bactérias fermentativas. A hidrólise pode ser a etapa mais lenta da fermentação, sendo influenciada pelos seguintes fatores: temperatura, pH, tempo de residência, composição da fonte de carbono e concentração dos produtos formados. Na acidogênese, os materiais oriundos da fase anterior são metabolizados pelas bactérias e convertidos em materiais mais simples, sendo eles ácidos orgânicos, álcoois. H₂ e CO₂ e novas células bacterianas. Grande variedade de bactérias fermentativas participa desta etapa, muitas pertencentes ao grupo Clostridia, que formam esporos, capazes de sobreviver a condições adversas. Na acetogênese, as bactérias acetogênicas oxidam os produtos da etapa anterior tornando-os fontes apropriadas para as bactérias metanogênicas. Ácido acético, CO₂ e H₂ são gerados e é possível a conversão do H₂ em ácidos orgânicos por parte das bactérias homoacetogênicas. Por fim, a metanogênese deve ser evitada. Dois tipos de microrganismos atuam nessa etapa: arqueas metanogênicas acetoclásticas, que utilizam acetato como fonte de carbono, e as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, que transformam H₂ e CO₂ em metano. Essas arqueas devem ser inativadas para evitar sua atividade de consumo do hidrogênio produzido, e consequente redução do rendimento do processo (CHERNICHARO, 2007; SÁ, *et al.*, 2014 & WANG, YIN, 2019).

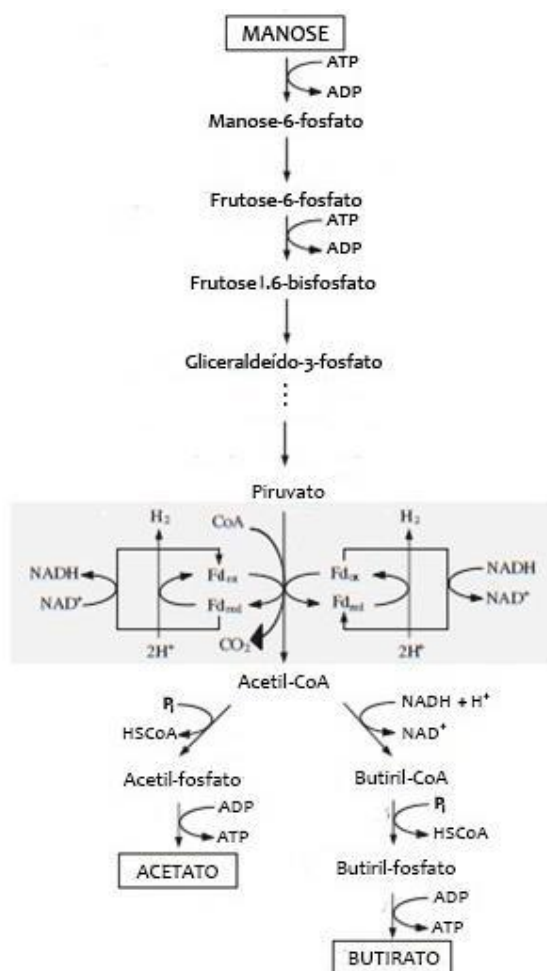
Figura 3. Etapas da digestão anaeróbia realizada por consórcio microbiano para produção de hidrogênio. Para um processo efetivo, a fase da metanogênese deve ser inibida.



Fonte: Adaptado de CHERNICHARO (2007).

Grande parte dos resíduos agroindustriais são formados majoritariamente por carboidratos, como é o caso da semente de açaí. Assim, o estudo da via metabólica percorrida durante a fermentação será direcionado para os processos que ocorrem quando carboidratos são as fontes de carbono. Considerando que o açúcar principal derivado da semente de açaí é a manose, a Figura 4 mostra as vias metabólicas de conversão da manose em hidrogênio.

Figura 4. Via glicolítica da fermentação em fase escura.

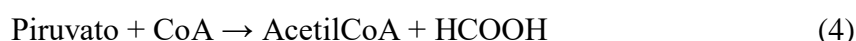


Adaptado de DE SÁ, *et al.* (2013).

Na via glicolítica (Figura 4), primeiramente, a manose é fosfatada a manose-6-fosfato e, posteriormente, convertida em frutose-6-fosfato, sua forma isomérica. Ocorre então, uma segunda fosforilação, gerando a frutose-1,6-bisfosfato, que dá origem ao gliceraldeído-3-fosfato pela ação da enzima aldolase. A partir deste ponto ocorrem uma série de reações de redução e oxidação, que resultam na formação de piruvato. Existem duas rotas de produção de hidrogênio a partir do piruvato. A primeira envolve as equações 2 e 3, e ocorre principalmente em bactérias anaeróbias obrigatórias. Pela ação da enzima piruvato desidrogenase (PDH) ocorre a formação de Acetil CoA. Durante esse processo a ferredoxina em suas formas reduzida e oxidada são responsáveis pela liberação de elétrons que quando unidos ao H^+ , formarão o gás H_2 , sendo catalisado pela enzima hidrogenase. Por fim, com a ação das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e acetato quinase (ACK), o Acetil CoA é degradado em etanol e acetato, respectivamente (SÁ, *et al.*, 2013 & WANG, YIN, 2019).



Na segunda rota de produção ocorrem principalmente as equações 4 e 5. O piruvato sofre ação da enzima piruvato formato-liase (PFL) catalisando a geração de formato, e forma Acetil CoA conforme descrito. Então, o formato é decomposto em H₂ e CO₂ com o auxílio das enzimas formato-hidrogênio liase (FHL) e hidrogenase (SÁ, *et al.*, 2013 & WANG, YIN, 2019).



O acúmulo dos ácidos graxos formados durante a produção de hidrogênio pode inibir o metabolismo das bactérias produtoras de hidrogênio e reduzir o rendimento. Isso pode ocorrer devido ao aumento da força iônica do meio ou devido à inibição por dissociação dos ácidos (ELBESHBISHY, *et al.*, 2017).

Existem diversos fatores que podem influenciar a fermentação para a produção de H₂, dentre eles: tipo de inóculo e pré-tratamento, temperatura de processo, pH do meio e fonte de carbono. A seguir será comentado como cada uma dessas variáveis pode afetar a produção de hidrogênio.

3.2.3.1 Tipo de inóculo e pré-tratamento

Podem ser utilizadas culturas de microrganismos puras ou mistas para a fermentação, contendo bactérias anaeróbias estritas ou anaeróbias facultativas. As bactérias anaeróbias obrigatórias proporcionam um maior rendimento na produção de hidrogênio (WANG, YIN, 2019).

As culturas puras oferecem como principal vantagem a sua seletividade em relação à fonte de carbono, que resultam em maior rendimento na produção de hidrogênio, e menor geração de coprodutos. Porém, essas culturas tornam o processo mais caro e mais complexo por demandarem a necessidade de se manter a assepsia do meio para evitar contaminação, sendo preciso um maior controle do meio (SÁ, *et al.*, 2013).

As culturas mistas de consórcios microbianos, como por exemplo, lodos anaeróbios de estações de tratamento de esgoto, apresentam a vantagem de não ser

necessário grandes esforços para controle e assepsia do meio, reduzindo os custos do processo. Além disso, consórcios microbianos são mais adaptáveis às adversidades no meio, como por exemplo, mudanças de temperatura e pH. Um ponto bastante relevante da utilização de consórcios microbianos é que se torna possível obtê-los por fontes naturais, reduzindo custos da produção, o que favorece a produção descentralizada de energia. A grande desvantagem apresentada pelo uso de consórcios microbianos é a possível presença de bactérias consumidoras de hidrogênio, que poderão reduzir o rendimento da produção. Para evitar a atividade destas bactérias e selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio, são realizados pré-tratamentos do inóculo com o objetivo de inativá-las ou eliminá-las (SÁ, *et al.*, 2013 & ELBESHBISHY, *et al.*, 2017).

Existem diversos tipos de pré-tratamentos de inóculo, os principais são: térmicos, ácidos e alcalino. O pré-tratamento térmico se baseia na habilidade de formação de endósporo que algumas bactérias produtoras de H₂ possuem quando submetidas ao estresse bacteriano em condições extremas. Enquanto isso, as arqueas metanogênicas, principais consumidores de H₂, não conseguem sobreviver em tais condições (SÁ, *et al.*, 2013).

Existem diversas combinações de temperatura e tempo de tratamento que podem ser adotadas durante o pré-tratamento térmico. No geral, temperaturas mais baixas requerem maior duração do tratamento. Por outro lado, a combinação de temperatura e tempo de reação altos pode ser letal para os microrganismos produtores de hidrogênio, reduzindo sua produção. Em 2014, Wong e colaboradores realizaram um estudo avaliando diversas combinações reportadas de condições adotadas para pré-tratamentos térmicos de inóculo para fermentação. Neste estudo, foi mencionado que as combinações de 65°C por 30 min (condição mesofílica com temperaturas mais amenas) e 100°C por 15 min (condição termofílica com temperatura mais severa) apresentaram o maior rendimento na produção de hidrogênio.

Os principais microrganismos produtores de hidrogênio que geralmente estão presentes nas culturas mistas são pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Enterobacter* e *Thermoanaerobacter*. As bactérias do gênero *Clostridium* se destacam pela capacidade de esporulação, permitindo sobrevivência a altas temperaturas, e pelo rápido metabolismo, proporcionando uma acelerada produção de hidrogênio. As bactérias do gênero *Thermoanaerobacter* tem sua produção de hidrogênio facilitada em temperaturas mais elevadas (SÁ, *et al.*, 2014).

3.2.3.2 Temperatura do processo fermentativo

A temperatura é um dos fatores de maior influência na fermentação anaeróbia. As diferentes temperaturas de operação podem definir qual rota metabólica que será seguida, já que determinadas temperaturas favorecem a predominância de diferentes bactérias (ELBESHBISHY, *et al.*, 2017). A temperatura influencia diretamente em dois aspectos do processo biológico: na taxa das reações enzimáticas e na taxa de difusão dos componentes do meio de cultivo (CHERNICHARO, 2007).

Existem 3 faixas de temperaturas com as quais se pode trabalhar: mesofílica (25°C – 40°C), termofílica (40°C – 65°C) e hipertemofílica (65°C – 80°C). No geral, existem duas temperaturas ideais de operação quando se trata de processos anaeróbios: uma na faixa mesofílica, próxima aos 35°C, e outra na faixa termofílica, próxima aos 55°C. A maioria dos estudos é realizado em condições mesofílicas, pois é a faixa de temperatura mais amena (CHERNICHARO, 2007; SÁ, *et al.*, 2014). O processo termofílico apresenta vantagens devido à sua taxa de reação mais rápida, resultando em maior produtividade se comparado ao processo mesofílico. Por outro lado, além do processo termofílico ser mais sensível à mudanças climáticas, pode ocorrer acidificação durante o processo, o que inibe a produção de H₂ (MAO, *et al.*, 2015).

3.2.3.3 pH

O pH também é uma das variáveis que mais influencia a fermentação para produção de H₂. Afeta não só a produção em si, mas também influencia na comunidade microbiana presente e, conseqüentemente, nos subprodutos que serão gerados dessa produção.

Os microrganismos produtores de metano e consumidores de hidrogênio, em sua maioria, apresentam pH ótimo de atuação entre 6,6 e 7,4, e são inibidos em valores de pH menores que 6,0 e acima de 8,0. As bactérias acidogênicas são mais resistentes a valores baixos de pH, mantendo sua atividade nestas condições, enquanto as metanogênicas seriam inibidas. (CHERNICHARO, 2007).

Estudos indicam que o pH ótimo de trabalho para a produção de H₂ por fermentação se encontra na faixa entre 5 e 7. Nesta faixa, a atividade das enzimas envolvidas na fermentação é favorecida (SÁ, *et al.*, 2014). Mao e colaboradores (2015) reportaram estudos nos quais conclui-se que em pH 6,0 a atividade da enzima hidrolítica é favorecida. Além disso, os autores reportaram que o pH ótimo da acidogênese estava

entre 5,5 e 6,5. Os melhores rendimentos de hidrogênio foram reportados em fermentações realizadas em pH 5,5.

3.2.3.4 Fonte de carbono

A fermentação anaeróbia é bastante versátil em relação às fontes de carbono que podem ser utilizadas, pois permite a produção de hidrogênio a partir de uma gama de compostos orgânicos, dentre eles estão: carboidratos, lipídeos e proteínas. A escolha da matéria-prima se dará pelos custos envolvidos em sua utilização e pela sua biodegradabilidade (FONSECA, 2016).

Os carboidratos mais simples, como glicose e sacarose, são as principais substâncias reportadas para a produção de hidrogênio, devido a sua característica de serem facilmente biodegradáveis (SÁ, *et al.*, 2014). Por outro lado, essas fontes de carbono apresentam custos elevados quando se trata de sua utilização em grande escala. Assim, a utilização de resíduos industriais, principalmente da indústria alimentícia, ricos em carboidratos se mostra uma alternativa que indica a possibilidade de viabilização do processo produtivo (FONSECA, 2016).

A biotransformação de resíduos industriais associa a produção de energia renovável com a disposição adequada dos rejeitos, sendo interessante do ponto de vista ambiental e econômico, agregando valor à respectiva cadeia produtiva (SÁ, *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que a concentração da fonte de nutrientes também pode causar inibição na produção de hidrogênio. A DQO (Demanda Química de Oxigênio) pode representar de forma indireta e aproximada a quantidade de matéria orgânica disponível, assim como a medida de SSV (Sólidos Suspensos Voláteis) indica a quantidade de microrganismos no meio. Estudos em batelada mostram que o rendimento de hidrogênio pode diminuir em operações com razão $DQO_{\text{substrato}}/SSV_{\text{inóculo}}$ maior que 6 em culturas mistas, tanto para fontes de carbono sintéticas como orgânicas (ELBESHBISHY, *et al.*, 2017).

3.2.3.5 Reatores

Os reatores anaeróbios são utilizados com a principal finalidade de estabilizar o lodo anaeróbio e promover o tratamento de efluentes com alta concentração de sólidos suspensos (CHERNICHARO, 2007). Biomassas lignocelulósicas são comumente utilizadas nos reatores como fonte de nutrientes para os processos biológicos que ocorrem.

Para que os processos biológicos aconteçam de forma eficaz algumas condições deve ser respeitadas: o lodo deve ser facilmente sedimentado, a fim de evitar a remoção dos microrganismos do biorreator e, o contato entre o lodo e o meio deve ser otimizado, aumentando a atividade dos microrganismos (CHERNICHARO, 2007 & STAZI, TOMEI, 2018).

O reator CSTR (*continuous stirred-tank reactor*), que atua de forma contínua, e o ASBR (*anaerobic sequential batch reactor*), que atua em regime batelada, são muito conhecidos por sua simplicidade e baixo custo. Nos reatores de membrana, a matéria orgânica com microrganismos se mantém fixada em suporte inerte. São exemplos de reatores de membrana o AF (*anaerobic filter reactor*), que se utiliza de filtros para fixar a matéria orgânica com os microrganismos, e o AFBR (*anaerobic fluidized bed reactor*), onde pequenas partículas são utilizadas como suporte. Os reatores de retenção mantem o lodo anaeróbio livre em seu interior, mantendo um controle rígido das condições para evitar *wash-out* da cultura microbiana. O exemplo mais conhecido e o mais adotado na indústria é o reator UASB, que forma um leito de lodo em sua base. O reator ABR (*anaerobic baffled reactor*), que consiste em vários compartimentos, também é um exemplo deste tipo de reator (MAO, *et al.*, 2015).

- Reator UASB

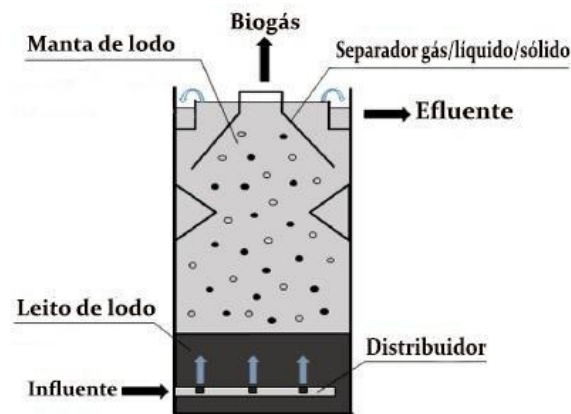
O reator anaeróbio de fluxo ascendente (Figura 5) - *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) - foi desenvolvido nos anos 1970 e é utilizado principalmente para tratamento de efluentes. Atualmente, o tratamento pelo reator UASB é considerado um dos tratamentos anaeróbios mais avançados tecnologicamente. É bastante valorizado por ser simples, compacto, de baixo investimento e de baixo custo de operação (MAO, *et al.*, 2015 & STAZI, TOMEI, 2018).

O UASB tem em sua estrutura dois principais constituintes que asseguram a condução do processo biológico de forma efetiva. O primeiro é o denso leito de lodo anaeróbio que é formado na base do reator, onde é encontrada a cultura microbiana que será responsável pelo processo biológico. É de extrema importância a manutenção da massa do lodo na parte inferior do tanque. Essa conformação garante um contato eficiente entre a massa microbiana contida no lodo e o efluente que entra no sistema pela parte inferior do tanque. O efluente tratado faz um movimento ascendente no tanque e deixa o sistema pela parte superior (CHERNICHARO, 2007; MAO, *et al.*, 2015; & STAZI, TOMEI, 2018).

O segundo é um separador gás-líquido-sólido localizado na parte superior do tanque, que assegura que as partículas de lodo carregadas pelo gás formado permanecerão dentro do reator, evitando o *wash-out* (CHERNICHARO, 2007 & STAZI, TOMEI, 2018).

A capacidade de sedimentação do lodo é um aspecto relevante na operação do reator UASB. Assim, são adotadas condições físicas e químicas adequadas para promover a floculação do lodo e, conseqüentemente, sua sedimentação por ação da gravidade (MAO, *et al.*, 2015 & STAZI, TOMEI, 2018).

Figura 5. Diagrama esquemático do reator UASB.



Fonte: STAZI, TOMEI (2018) - adaptado.

- Reator ASBR

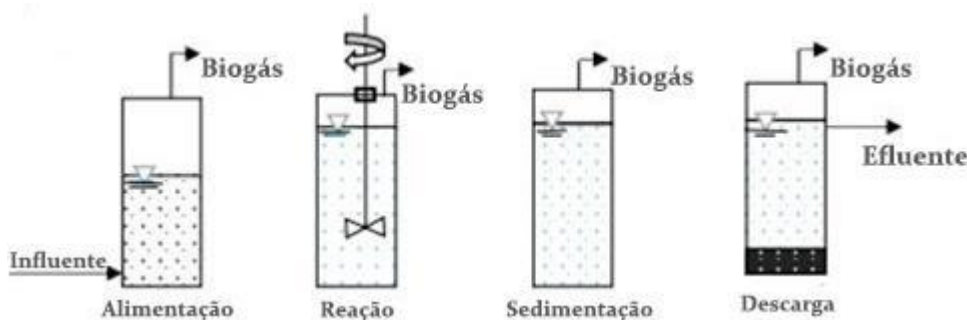
O reator anaeróbio em batelada sequencial – *anaerobic sequencial batch reactor* (ASBR) – é um reator de tanque único, que opera em regime não-contínuo e apresenta uma única unidade para tratamento e fermentação (MAO, *et al.*, 2015). É reconhecido por ser um método de alta eficiência para produção de gás e remoção de DQO da matéria orgânica e permitir um melhor controle de qualidade, se comparado a processos contínuos (LAPA, 2003 & AKIL, JAYANTHI, 2012).

No reator ASBR ocorrem quatro etapas durante o processo biológico: alimentação, reação, sedimentação e descarga (Figura 6). Na alimentação, a matéria orgânica é inserida no reator. Na reação, ocorre o processo biológico de fato e, para garantir maior contato da fonte de carbono com os microrganismos, é iniciada a agitação do sistema, que deve ser branda para não prejudicar a formação de flocos (AKIL, JAYANTHI, 2012). Na sedimentação, a agitação é interrompida e os grânulos se depositam no fundo do reator pela ação da gravidade, promovendo uma separação de

fases. Por fim, na descarga, o efluente tratado sobrenadante é retirado do reator (LAPA, 2003).

O ASBR permite a estabilização de altas cargas de DQO, devido ao contato dos microrganismos com diversas concentrações de matéria orgânica ao longo do tempo, aumentando o rendimento. Algumas desvantagens do uso deste reator são a ocorrência de zonas mortas e o tempo elevado para que ocorra a sedimentação. O tempo de reação pode variar de acordo com as características, concentração e composição da matéria-prima (LAPA, 2003).

Figura 6. Etapas do processo biológico no reator ASBR.



Fonte: WERKNEH, RENE (2019) – adaptado.

Considerando as informações apresentadas neste capítulo, percebe-se a necessidade de substituição das atuais fontes de energia por uma que seja mais sustentável e não cause prejuízos ao meio ambiente. O hidrogênio se apresenta como fonte de energia de grande potencial, já que não libera gases de efeito estufa durante sua combustão e possui elevado poder calorífico. No mesmo sentido, é interessante que todo o processo de produção também seja sustentável e, dentre os processos biológicos, a fermentação é a que se mostra mais vantajosa.

Por outro lado, também há problemas ambientais causados por acúmulo de resíduos agrícolas e agroindustriais que não são descartados de forma correta. O açaí é um fruto que vem apresentando grande aumento da sua produção nos últimos anos, porém a sua semente, que representa a maior parte da sua massa, é tratada como rejeito no seu processo de industrialização. Analisando sua composição, observa-se que a semente de açaí pode ser uma potencial fonte de matéria orgânica para a produção de hidrogênio.

Assim, para que se possa expandir conhecimentos sobre esse tópico na busca de uma fonte de energia alternativa, é de extrema importância o estudo sobre o processo fermentativo, possíveis fontes de matéria-prima, otimização de parâmetros e possibilidade de aumentar escala. Neste sentido, o mapeamento tecnológico apresenta sua

relevância, contribuindo para a identificação das principais áreas de estudos do tema, seus avanços e gargalos, e o desenvolvimento das tecnologias mais recentes.

4 MAPEAMENTO TECNOLÓGICO

4.1 INTRODUÇÃO

O mapeamento tecnológico é uma ferramenta muito útil para se avaliar o nível de desenvolvimento tecnológico de um produto ou de uma tecnologia, além de possibilitar a avaliação da evolução do respectivo mercado. Através da busca orientada sobre um tema específico em bases de dados especializadas, é possível extrair informações e estabelecer relações entre elas. A análise e a disposição destas informações de forma organizada permitem identificar o estágio atual de desenvolvimento e estimar sua evolução e o nível que se pode alcançar (BORSCHIVER, SILVA, 2016).

Artigos científicos são ricas fontes de informação no cenário acadêmico, são os principais veículos de resultados e de transmissão de conhecimento neste campo. Estes documentos são utilizados como indicadores de longo prazo, já que se encontram na fase de estudo acadêmico, grau inicial de desenvolvimento. Da mesma forma, as patentes são utilizadas como fonte de informação sobre inovação e atividades de invenção, indicando um nível mais elevado de desenvolvimento. É por meio destes documentos que empresas solicitam a proteção e sigilo de suas tecnologias de pesquisa e desenvolvimento. Estes documentos são utilizados como indicadores de médio e curto prazo, considerando patentes sob análise e patentes já concedidas, respectivamente, sendo a última mais próxima da fase comercial (BORSCHIVER, SILVA, 2016).

As informações extraídas dos documentos mencionados, são organizadas em estruturas de nível Macro, Meso e Micro. No nível Macro são dispostas as informações mais imediatas sobre o documento, como local, instituição e periódico de publicação. No nível Meso os artigos e patentes são agrupados em taxonomias, de forma abrangente, de acordo com o tema geral abordado. No nível Micro, os documentos são expostos em subgrupos de acordo com seu principal objetivo (BORSCHIVER, SILVA, 2016).

4.2 ARTIGOS

4.2.1 Metodologia de pesquisa

A plataforma Scopus (www.scopus.com) foi utilizada como base para a pesquisa dos artigos científicos que foram utilizados como fonte de informação para a elaboração do mapeamento tecnológico. Esta plataforma pertence à editora Elsevier e é uma das maiores bases de artigos científicos existentes, se mostrando adequada para ser utilizada como fonte de informação do mapeamento tecnológico.

Os artigos utilizados na análise foram encontrados buscando as seguintes palavras-chave e condicionais de pesquisa: “hydrogen” AND NOT “peroxide” AND NOT “sulfide” nos títulos de artigos, AND “production” AND “biological” OR “biotechnological” nos resumos dos artigos. A busca foi limitada para documentos do tipo artigo e para publicações realizadas no período entre os anos de 2014 e 2019.

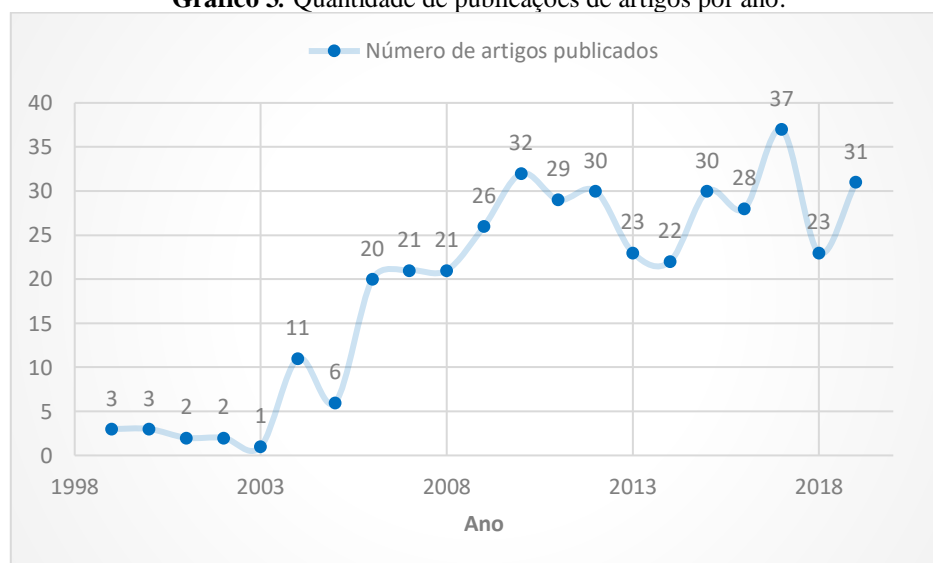
A restrição relacionada às palavras “sulfide” e “peroxide” foi adicionada na busca, pois sem elas as buscas exibiam resultados numerosos para artigos que tratavam de produção de outras substâncias utilizando sulfeto de hidrogênio ou peróxido de hidrogênio em alguma das etapas.

A busca foi realizada entre os dias 14 de outubro e 2 de novembro do ano de 2019. Desta forma não se obteve informações sobre os artigos publicados após o dia 2 de novembro de 2019.

4.2.2 Análise Macro

As análises preliminares foram realizadas a partir dos dados disponibilizados pela plataforma Scopus relativas aos anos de publicação e aos temas abordados nos artigos entre os anos de 1999 e 2019. Primeiramente, foram analisados os dados respectivos às publicações de artigos por ano. As informações estão disponibilizadas no Gráfico 3.

Gráfico 3. Quantidade de publicações de artigos por ano.



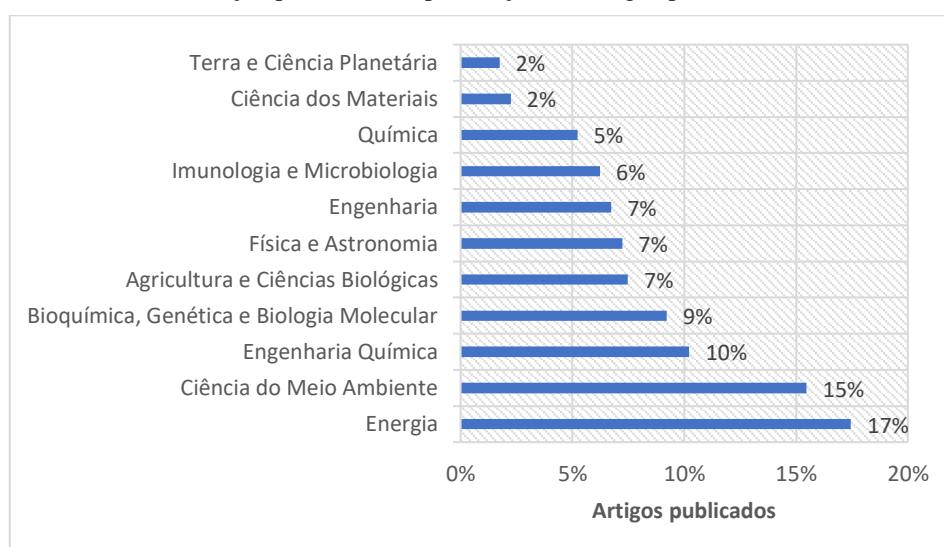
Fonte: busca na base Scopus (1999 – novembro/2019).

A partir do Gráfico 3 é possível notar que até o ano de 2003 as publicações de artigos eram extremamente baixas, não ultrapassando o número de três publicações em

um ano. A partir de 2003 foi possível perceber um aumento considerável no número de publicações, apresentando pequenas oscilações, e atingindo seu máximo no ano de 2017 com 37 publicações. É importante ressaltar que o número apresentado relativo ao ano de 2019 não representa todos os artigos publicados neste ano, visto que a busca foi realizada apenas até o início do mês de novembro de 2019, e os artigos publicados após esta data não foram considerados para a análise.

Além dos dados relativos às publicações por ano, também foi possível obter diretamente da base Scopus informações sobre as principais áreas de conhecimentos abordadas nos artigos do ano 2000 até novembro de 2019. As informações encontram-se disponíveis no Gráfico 4.

Gráfico 4. Distribuição percentual de publicações de artigos por área de conhecimento.



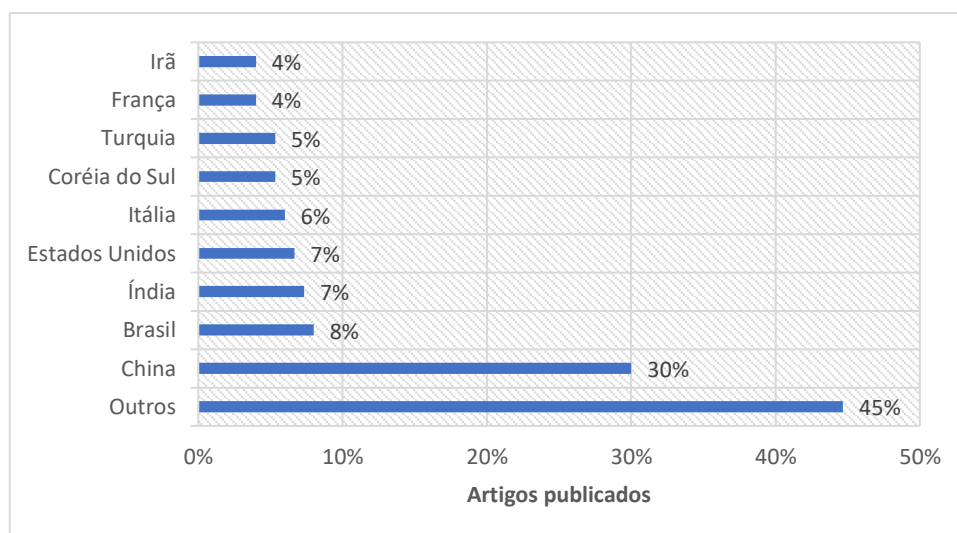
Fonte: busca na base Scopus (1999 – novembro/2019).

É possível perceber a partir do Gráfico 4 que grande parte dos artigos publicados aborda as áreas do conhecimento de Energia ou Ciência do Meio Ambiente, sendo ambos os temas presentes em mais de 15% dos artigos. Dentre os artigos que compunham o grupo de Energia, um deles propunha induzir a formação de biofilme em um painel para instalação em fotobiorreator, possibilitando a otimização da produção de hidrogênio por adoção de um processo contínuo (ZHANG, *et al.*, 2019). Por outro lado, um dos artigos presentes no grupo de Ciência do Meio Ambiente apresentou uma revisão sobre técnicas da microbiologia que contribuíam para processos fermentativos que se utilizavam de resíduos orgânicos como fonte de carbono para produção de hidrogênio (WANG, YIN, 2019).

A partir deste ponto foi realizada uma análise individual dos artigos publicados entre os anos de 2014 e 2019, e foram coletadas e analisadas informações contidas nestes documentos, como: países de origem, periódicos de publicação e organizações responsáveis pelas pesquisas. Foram encontrados no total 178 artigos utilizando a metodologia de pesquisa citada anteriormente. Dentre estes, 28 artigos não abordavam em nenhum aspecto a produção biológica de hidrogênio, desta forma, estes artigos foram desconsiderados para as seguintes análises, e os resultados obtidos foram baseados apenas nos 150 artigos restantes.

A partir da análise individual dos artigos foi possível coletar novas informações que deram origem a novos indicadores. O Gráfico 5 apresenta um desses indicadores, exibindo a distribuição percentual de artigos publicados de acordo com seus países de origem.

Gráfico 5. Distribuição percentual de artigos publicados em relação aos países de origem.

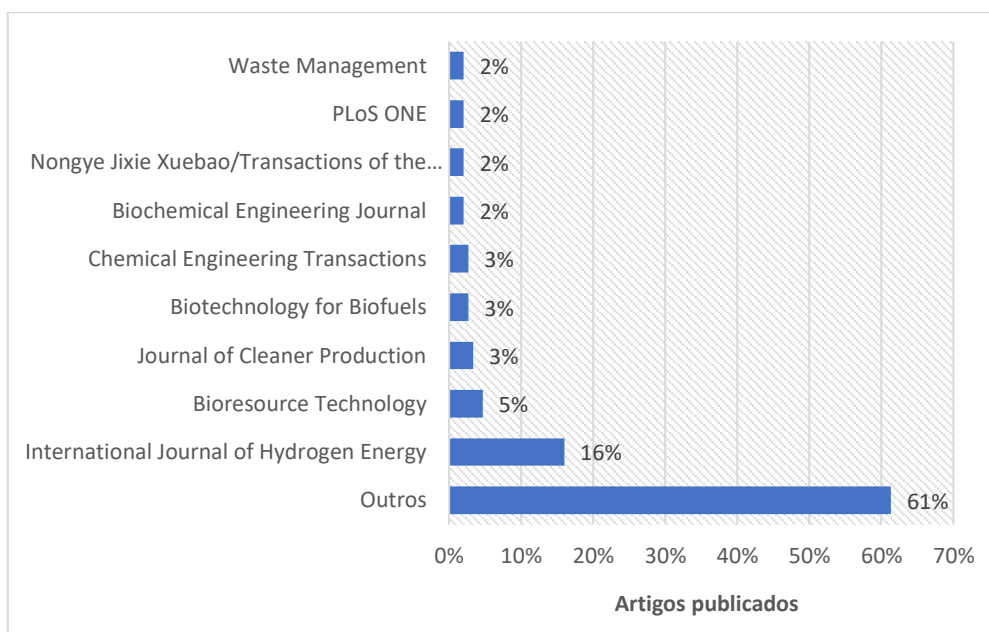


Analisando o Gráfico 5 é perceptível a soberania da China na publicação de artigos que abordam a produção biológica de hidrogênio, representando 30% do total de publicações. Percebe-se que este número é bastante significativo quando se avalia o percentual de publicação dos países que a seguem. O Brasil foi o segundo país com maior quantidade de publicações, sendo responsável por 8% das publicações, seguido de Índia e Estados Unidos que individualmente são responsáveis por 7% do total de artigos publicados.

Outro indicador analisado foi a quantidade de artigos publicadas por periódico. Esse dado é importante pois indica qual periódico possui a maior quantidade de

publicações no assunto e que, conseqüentemente, é o mais adequado para se pesquisar sobre o assunto. No Gráfico 6 se encontram os dados referentes aos periódicos que mais publicaram no período analisado.

Gráfico 6. Distribuição percentual de artigos publicados por periódico.



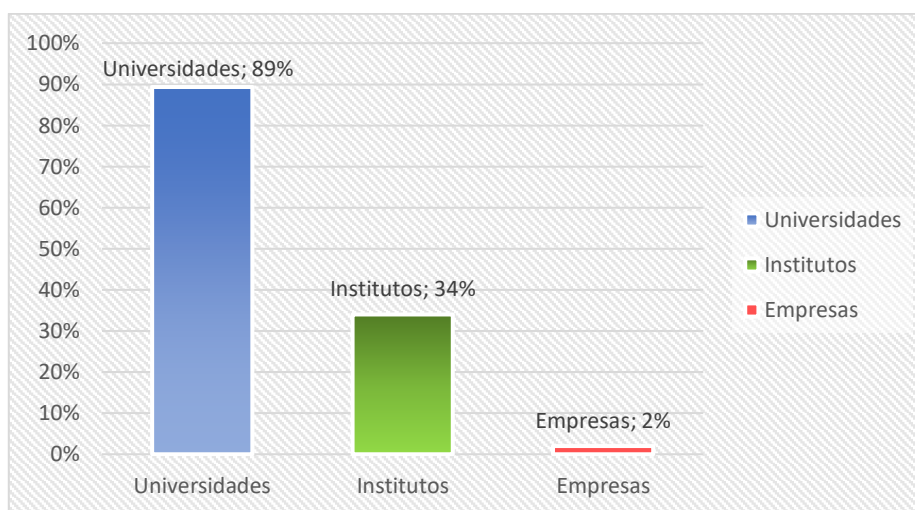
International Journal of Hydrogen Energy é um periódico científico publicado pela editora Elsevier que é voltado para artigos que tratem dos diversos aspectos da energia do hidrogênio. Ele se destacou dentre os periódicos por apresentar a maior frequência de publicação de artigos relacionados a produção biológica de hidrogênio. Ele foi responsável por cerca de 16% do total de publicações analisadas, que é uma frequência bastante expressiva se consideramos os demais periódicos. Um dos seus artigos publicados aborda o impacto do pré-tratamento térmico da matéria-prima, rejeitos de alimentos, na produção em etapa única de hidrogênio e metano. Foi relatado que apesar da produção de metano não ter sofrido grandes alterações, houve um aumento considerável da produção de hidrogênio (PAGLIACCIA, *et al.*, 2016).

Bioresource Technology é uma revista científica publicada quinzenalmente também pela editora Elsevier, que permeia temas como: biomassas, tratamento biológico de rejeitos, bioenergia e biotransformação. Foi o segundo periódico que mais publicou artigos, representando cerca de 5% das publicações. Um dos artigos publicados propôs a imobilização de bactérias para realização de processo contínuo de produção de hidrogênio

em biorreator e evitar *wash-out* das células durante a fermentação, obtendo resultados positivos (ZHAO, *et al.*, 2017).

Os dados relacionados à distribuição de artigos publicados por Centros de Pesquisa dentre Universidades, Institutos e Empresas também foram analisados. É importante identificar quais centros possuem a maior frequência de publicação. Os resultados estão indicados no Gráfico 7.

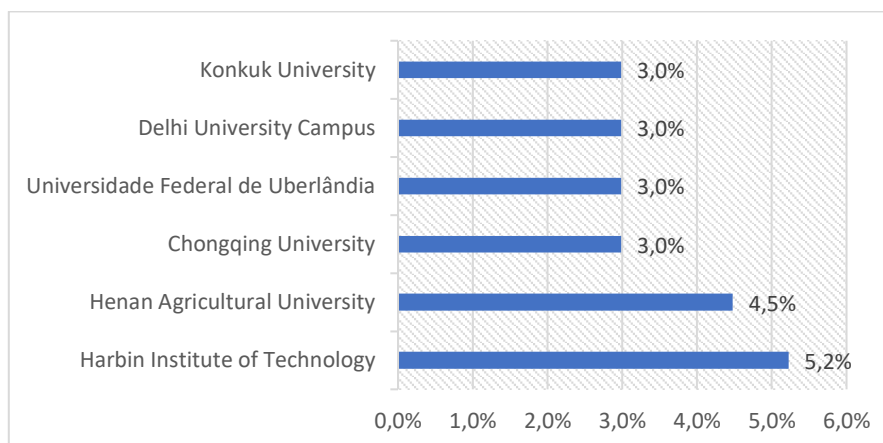
Gráfico 7. Distribuição percentual de publicações de artigos por centros de pesquisa.



Analisando o Gráfico 7 é possível concluir que as Universidades são grandes agentes atuantes nas pesquisas que abordam produção biológica de hidrogênio. Elas estão presentes em 89% dos artigos publicados explorados, ressaltando sua grande relevância e detenção do conhecimento sobre o assunto. Os Institutos também possuem bastante relevância no assunto, sendo responsáveis por 34% dos artigos publicados. Por outro lado, as empresas possuem uma participação ínfima neste caso, sendo responsáveis por apenas 2% do total das publicações analisadas.

No Gráfico 8 encontram-se expostas as seis principais universidades com participação nos artigos analisados, estas são responsáveis pelas maiores quantidades de publicações. Ao todo foram identificadas 162 universidades diferentes atuando na publicação de artigos.

Gráfico 8. Distribuição percentual de artigos publicados pelas principais Universidades.



Harbin Institute of Technology foi a maior publicadora de artigos, sendo responsável pela publicação de 5,2% dos artigos dentre os publicados por universidades. Ela é uma universidade voltada para pesquisa, fundada no ano de 1920, e muito respeitada no seu país de origem, a China. Nas suas publicações são abordadas principalmente processos de fermentação escura, em um deles, utilizou-se o lodo anaeróbio ativado, e noutro, foi adotada a utilização de bactérias termofílicas.

Henan Agricultural University foi segunda universidade que mais publicou artigos relacionados ao assunto pesquisado, sendo responsável por 4,5% das publicações com participações de universidades. Ela é uma universidade pública, fundada no ano de 1912, e que também fica localizada na China. Dentre seus artigos publicados, se encontram principalmente artigos que tratam da utilização de partes da planta do milho como matéria-prima, e da adoção de processos fotossintético e fermentativos para produção de hidrogênio, inclusive em um dos artigos estes processos são praticados de forma combinada.

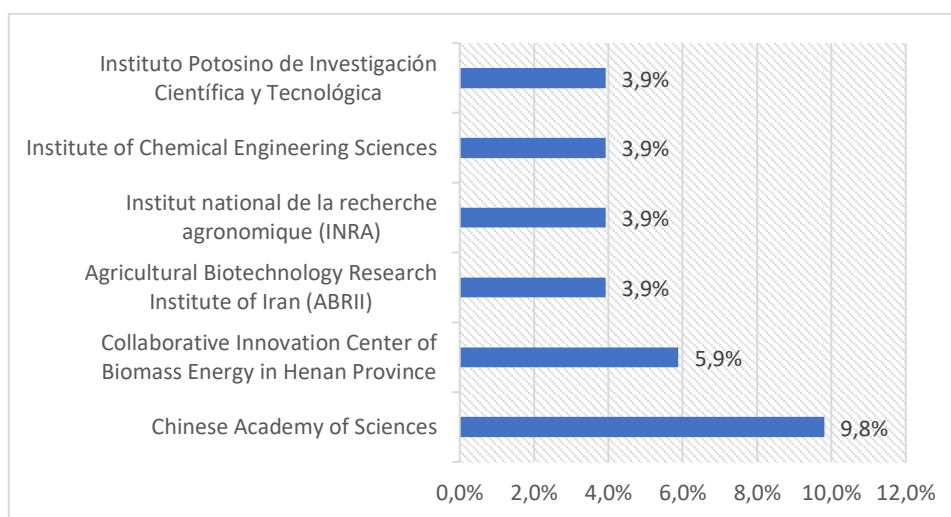
A Universidade Federal de Uberlândia aparece como principal representante brasileira na publicação de artigos, sendo responsável por 3% dentre os publicados por universidades. As principais abordagens são sobre consórcios microbianos na produção de hidrogênio por processos fermentativos. Outras universidades brasileiras que também estiveram presentes nas análises foram: Universidade de São Paulo, Universidade Federal de São Carlos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, entre outras.

As demais universidades presentes no Gráfico 8, *Konkuk University* (na Coreia do Sul), *Delhi University* (na Índia), e *Congqing University* (na China), também representaram 3% das publicações com participações de universidades, cada uma. De

todas as sete universidades que mais publicaram no tema, apenas a *Konkuk University* é uma instituição privada, sendo todas as demais instituições públicas de ensino e pesquisa.

No Gráfico 9 pode-se observar a mesma relação contendo os principais Institutos de pesquisas que realizaram a maior quantidade de publicações em bioprodução de hidrogênio. Houve um total de 45 institutos diferentes envolvidos na publicação de artigos.

Gráfico 9. Distribuição percentual de artigos publicados pelos principais Institutos.



A instituição de pesquisa com mais publicações no assunto de interesse foi a *Chinese Academy of Science*, sendo responsável por 9,8% das publicações. Suas publicações, em sua maioria, almejam otimizar a produção de hidrogênio, assim, algumas técnicas foram testadas, como por exemplo sistemas eletrocatalíticos, uso de surfactantes, e fototaxia.

Os institutos brasileiros presentes no mapeamento foram Instituto Federal de Alagoas e o Instituto Mauá de Tecnologia, sendo responsáveis pela publicação de um artigo cada, representando aproximadamente 2% das publicações por institutos.

Apenas 4 empresas foram identificadas como instituições publicadoras dos artigos selecionados para o mapeamento tecnológico, sendo cada uma responsável por apenas um artigo. As empresas foram: *Harbin Pharmaceutical Group Bioengineering CO. LTD* e *SynfuelsChina Co. Ltd.* (ambos com sede na China), *Centro Ricerche FIAT* (na Itália) e *Cell Free Bioinnovations Inc* (nos Estados Unidos).

4.2.3 Análise Meso

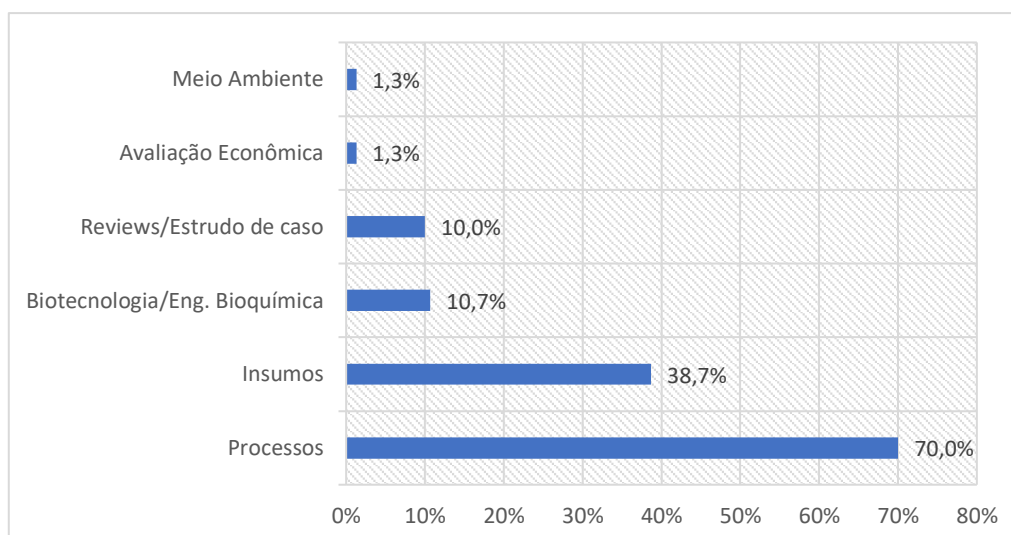
A análise Meso foi realizada com o objetivo de categorizar os artigos selecionados para análise, de acordo com o tema abordado em seu escopo. Foram criadas seis taxonomias a fim de agrupar os artigos analisados. Na Tabela 1 se encontram as taxonomias criadas e suas respectivas descrições. Vale mencionar que um artigo pode estar presente em mais de um grupo.

Tabela 1. Descrição e quantificação das taxonomias da análise Meso dos artigos analisados no mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de artigos</i>
1	Processos	Alteração, comparação, simulação, execução ou análise do processo produtivo biológico de H ₂	105
2	Insumos	Avaliação do comportamento ou da influência dos insumos na produção biológica de H ₂	58
3	Biotecnologia e Eng. Bioquímica	Estudo de formas de “engenhear” ou aprimorar tecnologicamente os processos bioquímicos envolvidos na produção de H ₂	16
4	Reviews/Estudo de caso	Revisão bibliográfica sobre uma determinada etapa da produção ou análise da produção biológica de H ₂ de uma determinada localização específica.	15
5	Avaliação Econômica	Estudo de viabilidade econômica de um processo produtivo ou do panorama econômico do bioH ₂	2
6	Meio Ambiente	Impactos causados por processos de produção biológica de H ₂ ao meio ambiente	2

O Gráfico 10 foi organizado de modo a dispor a distribuição das taxonomias da análise Meso de acordo com os assuntos mais abordados nos artigos selecionados para análise do mapeamento tecnológico.

Gráfico 10. Distribuição de taxonomias da análise Meso em relação aos artigos utilizados para o mapeamento tecnológico.



As taxonomias mais presentes nos artigos analisados foram: Processos e Insumos. Nota-se que Processos foi a taxonomia presente de forma mais expressiva nos artigos selecionados, representando aproximadamente 70% do total de artigos analisados. Seguida por Insumos que aparece em cerca de 38,7%. Isso indica que grande parte das pesquisas realizadas sobre produção biológica de hidrogênio são focadas no processo produtivo, ou nos insumos presentes na reação, ou de ambos.

As taxonomias Biotecnologia e Eng. Bioquímica, Reviews e Estudo de caso, Avaliação Econômica e Meio Ambiente aparecem em seguida, representando aproximadamente 11%, 10%, 1% e 1% do total de artigos utilizados para o mapeamento tecnológico, respectivamente.

4.2.4 Análise Micro

4.2.4.1 Processos

A taxonomia Processos foi subdivida em cinco micros: Produção, Otimização, Modelagem e Simulação, Purificação e Separação, e Termodinâmica. Na Tabela 2 encontram-se a organizadas as informações sobre os subgrupos criados.

Tabela 2. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Processos dos artigos analisados no mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de artigos</i>
1	Produção	Alteração, comparação ou execução de metodologias de produção biológica de H ₂	53
2	Otimização	Estudo da variação de parâmetros analíticos visando a maximização da produção biológica de H ₂	50
3	Modelagem e Simulação	Investigação da produção biológica de H ₂ através de modelagem ou simulação computacional	5
4	Purificação e Separação	Recuperação ou purificação do H ₂ produzido biologicamente	4
5	Termodinâmica	Avaliação pelo viés termodinâmico da produção biológica de H ₂	1

As Micros Produção e Otimização foram os temas presentes na maior parte dos artigos da taxonomia Processos, representando aproximadamente 50% e 47% dos artigos presentes na taxonomia, respectivamente. Vale ressaltar que alguns artigos tocavam em ambos assuntos em suas discussões. As três demais Micros apresentaram participação bastante reduzida, sendo Modelagem e Simulação, Purificação e Separação, e Termodinâmica responsáveis por 5,7%, 3,8% e 1,0% dos artigos presentes nesta taxonomia, respectivamente.

- Produção

Se tratando da taxonomia Produção foram discutidas diversas formas de realizar o processo de produção biológica de hidrogênio. As produções pelas metodologias fotobiológica e fermentação escura foram as mais mencionadas nos artigos, inclusive foi citado também um processo produtivo híbrido combinando ambas metodologias (CHENG, *et al.*, 2015). Em relação ao processo fotobiológico foram testados foto biorreatores para processos contínuos. Testes em outros tipos de reatores também foram citados, como por exemplo os reatores UASB (BASSANI, *et al.*, 2016) e os reatores de leito fixo.

A metodologia bio-eletroquímica para a produção de hidrogênio também foi relatada dentre os artigos deste grupo, porém em menor frequência se comparada às metodologias citadas anteriormente.

A discussão sobre a produção sequencial, em duas etapas, de hidrogênio e posteriormente de metano se mostrou bastante relevante dentro dessa taxonomia. Diversos artigos relatam a co-produção de metano como uma maneira de esgotar de forma mais eficiente as fontes de carbono, resultando em uma maior produção de energia, visto que o metano também pode ser aplicado como combustível (GOTTARDO, *et al.*, 2015; ALEXANDROPOULOU, *et al.*, 2016 & BASSANI, *et al.*, 2016).

Também foram encontrados artigos que discorriam sobre a produção marítima de hidrogênio, os assuntos tratados foram: o desenvolvimento de tecnologias marinhas visando a produção de H₂ por algas hipertermofílicas (KIM, *et al.*, 2019), e a solubilização do H₂ no oceano atlântico (WALTER, *et al.*, 2016).

- Otimização

A taxonomia Otimização engloba artigos que buscam aumentar a produção ou o rendimento de hidrogênio alterando alguma das variáveis do processo. As condições de operação foram discutidas em grandes proporções. Destas, o efeito da temperatura, do pH e da concentração da fonte de carbono foram os parâmetros mais discutidos, sendo por vezes, citados mais de um deles em um mesmo artigo. Tempo de reação e catalisadores também foram citados como variáveis alvos de estudos.

Outro parâmetro bastante discutido foi o pré-tratamento dos inóculos, sendo citados pré-tratamentos térmicos (ROMÃO, *et al.*, 2018 & PAGLIACCIA, *et al.*, 2016), hidrotérmicos (ZHAO, *et al.*, 2016) e ácidos (RUGGERI, *et al.*, 2015).

A presença e a concentração de alguns nutrientes no meio foram estudadas focando principalmente na influência de nitratos, fosfatos e carbonatos em alguns estudos. Parâmetros importantes como concentração de certas proteínas e carboidratos, carga orgânica presente no meio e diferentes suportes para imobilização de células também foram abordados em estudos

- Modelagem e Simulação

Na taxonomia Modelagem e Simulação foram encontrados artigos de temas diversos. Foram mencionadas simulações de processos sequenciais de produção de hidrogênio e metano em cascata (CHORUKOVA, 2019) e em reator agitado (BORISOV, *et al.*, 2016).

- Purificação e Separação

Em relação à taxonomia Purificação e Separação existem artigos que discutem formas de purificar ou separar o hidrogênio produzido biologicamente. Apenas dois métodos foram citados pelos artigos analisados: filtração por membranas e separação por adsorção. Em relação a adsorção foi estudada a produção e armazenamento de adsorventes sólidos de misturas H₂-CH₄ (CAPUTO, *et al.*, 2015), e foram estudados três tipos de carbono aditivado para captura de CO₂ e purificação do H₂ produzido biologicamente (GIL, *et al.*, 2015). Por outro lado, com o objetivo de separar misturas H₂-CO₂, foi discutido o desenvolvimento de uma membrana polimérica (MALAGÓN-ROMERO, *et al.*, 2016) e foi abordada a montagem e testes de um sistema em pequena escala de filtração por membrana (LASSMANN, *et al.*, 2016).

- Termodinâmica

Por fim, a taxonomia Termodinâmica apresentou apenas um artigo em seu grupo, o qual abordava a produção biológica de H₂ com uma bactéria fotossintética, variando a concentração de CO₂, em um fotobiorreator, a partir do conceito termodinâmico de exergia (HOSSEINI, *et al.*, 2015).

4.2.4.2 Insumos

A taxonomia Insumos foi a segunda mais representativa e pode ser subdivida em dois subgrupos: Microrganismos e Inóculo, e Matérias-primas. Na Tabela 3, encontram-se as informações relativas a cada Micro e sua respectiva descrição.

Tabela 3. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Insumos dos artigos analisados no mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de artigos</i>
1	Microrganismos e Inóculo	Investigação dos microrganismos ou inóculo que participam da produção biológica de H ₂	33
2	Matérias-primas	Análise da influência da composição e da viabilidade da utilização de determinadas biomassas como matéria-prima para a produção de H ₂	28

A Micro Microrganismos e Inóculo foi responsável por cerca de 57% dos artigos da taxonomia Insumos. A micro Matéria-prima também foi bastante expressiva,

representando aproximadamente 48% dos artigos. Parte dos artigos se encaixam em ambas Micros, por tratarem dos dois assuntos.

- Microrganismos e Inóculo

Na taxonomia Microrganismos e Inóculo foram avaliados o comportamento e a influência dos microrganismos na produção de hidrogênio. Alguns gêneros de microrganismos citados foram *Clostridium*, *Rhodospseudomonas*, *Chorella*, *Enterococcus* e *Bacillus*. A alta frequência de estudos sobre produção de hidrogênio a partir de microalgas mostra sua relevância no atual cenário. A utilização de culturas mistas foi bastante abordada devido a sua praticidade, inclusive Patel, *et al.* (2017) estudou a utilização de culturas mistas de microrganismos na fermentação escura. Dentre as culturas mistas o lodo anaeróbio ativado foi citado diversas vezes, isto se deve a seu baixo custo e a facilidade de não exigir um meio estéril. Alguns estudos investigaram a composição da comunidade microbiana no meio de produção de hidrogênio, permitindo o melhor conhecimento do processo. Também foi abordada a produção de hidrogênio a partir de bactérias termofílicas, o que requer condições mais severas, mas pode proporcionar maiores rendimentos.

- Matérias-primas

No grupo composto pela taxonomia Matérias-primas, estão presentes artigos que discorrem sobre as fontes de carbono da produção biológica de hidrogênio. As matérias-primas mais estudadas dentre os artigos analisados são resíduos e efluentes no geral, propondo uma finalidade e uma disposição adequada e agregando valor aos resíduos. Os mais abordados são as biomassas provenientes de efluentes agroindustriais, como palha de trigo e óleo de palma (LAZARO, *et al.*, 2015), estes possibilitam integração energética da cadeia produtiva e evitam desperdícios da indústria. Outras fontes de carbono comumente citados são as águas residuais (MONTI, *et al.*, 2015), tanto provindos de resíduos municipais, como da agroindústria (por exemplo resíduo de mandioca); resíduos sólidos municipais e resíduos de alimentos também foram mencionados como fonte de carbono para produção de hidrogênio (ALIBARDI, COSSU, 2016). Alguns artigos discorreram sobre a produção de hidrogênio a partir de biomassa mistas (*mixed biomass*), geralmente compostos pela combinação de resíduos de alimentos ou agroindustriais de diversas origens (PATEL, *et al.*, 2017).

4.2.4.3 Biotecnologia e Engenharia Bioquímica

A taxonomia Biotecnologia e Engenharia Bioquímica foi subdividida em três Micros: Biodesign, Imobilização do Inóculo e Rota Metabólica, conforme disposto na Tabela 4, junto a suas respectivas descrições.

Tabela 4. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Biotecnologia e Engenharia Bioquímica dos artigos analisados no mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de artigos</i>
1	Biodesign	Estudo ou alteração genética dos microrganismos envolvidos na produção H ₂	8
2	Imobilização do Inóculo	Diferentes práticas de aprisionamento das células do inóculo em um suporte	6
3	Rota Metabólica	Alteração da rota metabólica por meio de inibição, expressão ou modificação de fatores biológicos	4

As Micros se expressaram em quantidades parecidas, sendo Biodesign, Imobilização do Inóculo e Rota Metabólica responsáveis por 47,0%, 35,3% e 23,5% dos artigos da taxonomia, respectivamente.

- **Biodesign**

Foram abordados assuntos como transcrição e re-anotação de genomas, com o intuito de adquirir informações e melhorar a produção de hidrogênio (CHOWDHARY, *et al.*, 2015), e correlacionar com a expressão de proteínas e enzimas e com as rotas metabólicas (ORTEGA-RAMOS, *et al.*, 2014 & CALUSINSKA, *et al.*, 2015). Modificação de proteínas (GINOVSKA-PANGOVSKA, *et al.*, 2014 & SOMMER, *et al.*, 2016), e re-engenharia do sistema sensível a H₂ de um microrganismo também foram discutidos (BARAHONA, *et al.*, 2016). Foram mencionados métodos para expressão de enzimas para influenciar a rota metabólica a ser seguida (AVILAN, *et al.*, 2018) e o aumento da expressão de um plasmídeo que influenciava na etapa limitante da produção de hidrogênio (BALTZ, *et al.*, 2014).

- Imobilização do inóculo

A Micro Imobilização do inóculo é composta por artigos que abordam imobilização de microrganismos envolvidos na produção de hidrogênio. Dentre os artigos deste subgrupo dois deles mencionam imobilização por encapsulamento, um por alginato, que analisou as melhores condições para a imobilização (MASWANNA, *et al.*, 2018) e, o outro em suporte de nylon, que investigou qual tipo e concentração de cultura de microrganismos seriam mais vantajosas (ELKAHLOUT, *et al.*, 2019). Outros artigos estudaram a imobilização das células para aplicação em biorreatores. Alguns, visam evitar o *wash-out* da cultura microbiana durante processos contínuos, enquanto outros utilizam da formação de biofilme de bactérias fotossintéticas (ZHANG, *et al.*, 2016), há ainda um que cita a utilização de pellets de micélio (ZHAO, *et al.*, 2017). Os demais tratam de processos em batelada, onde são analisados diversos suportes para a imobilização (GOKFILIZ, KARAPINAR, 2017), ou a influência da concentração de nutrientes da imobilização (ELKAHLOUT, *et al.*, 2017).

- Rotas Metabólicas

Em um dos artigos foi abordado o estudo de duas rotas de fotoprodução de hidrogênio, direta e indireta, modificando a expressão da enzima NA(P)H desidrogenase tipo II na tentativa de melhorar a etapa limitante do processo (BALTZ, *et al.*, 2014). Em outro, foi estudada a dinâmica de uma tiol-proteína na sua rota metabólica, e como ela influenciaria na atividade de uma enzima hidrogenase anaeróbia (SADLER, *et al.*, 2016). Por fim, foi abordada uma rota alternativa da via glicolítica na *Echerichia coli*, onde era acionada a rota pela ativação da pentose fosfato (SEOL, *et al.*, 2016).

4.2.4.4 Reviews e Estudo de Caso

Dentre os artigos de tema Reviews foram classificados artigos onde é abordado algum tópico da produção biológica de hidrogênio a partir do conhecimento provindo de outras fontes científicas. Neste grupo o principal tema discutido foram análise e alteração de processos, onde foram citados processos de duas etapas para produção sucessiva de metano e a fermentação escura. Além disso, foram citados avanços na bioprodução de hidrogênio a partir de biomassa e resíduos orgânicos, pré-tratamento do inóculo e melhores alternativas na bioprodução de hidrogênio para o meio ambiente.

Os artigos de tema Estudo de Caso dissertam sobre análises da produção de biohidrogênio em locais específicos. Holanda, México, Brasil e Coreia do Sul foram

citados como locais de análise. Os assuntos abordados envolviam estágio atual, desafios e perspectiva da produção e tecnologia de produção biológica de hidrogênio.

4.2.4.5 Avaliação Econômica

Se tratando dos artigos presentes na taxonomia Avaliação Econômica, os temas mais discutidos foram a viabilidade econômica da execução de um processo produtivo de hidrogênio biológico. Ambos foram focados no caso da Coréia do Sul, um realizou uma análise econômica, sob o viés de Disposição para Pagar, do biohidrogênio marinho (KIM, *et al.*, 2019). O outro avaliou através do *Analytic Hierarchy Process*, utilizando fatores econômicos, financeiros e de processos, qual técnica de produção de hidrogênio, dentre as estudadas, seria a mais vantajosa (CHUNG, *et al.*, 2014).

4.2.4.6 Meio Ambiente

Ambos os artigos presentes na taxonomia Meio Ambiente avaliavam os impactos gerados pela produção biológica de hidrogênio ao meio ambiente. Um deles investiga o processo produtivo de biohidrogênio avaliando se está de acordo com os 12 princípios da química verde (ÇELIK, YILDIZ, 2017). O outro define um protocolo para minimizar o impacto da produção de H₂ no aquecimento global, e aplica o protocolo na produção biológica e em outras formas de produção de H₂ (VALENTE, *et al.*, 2017).

4.3 PATENTES

4.3.1 Metodologia de pesquisa

A base da USPTO (*United States Patent and Trademark Office* – www.uspto.gov) foi selecionada para coleta de informações sobre as patentes solicitadas e concedidas que discorrem sobre a produção biológica de hidrogênio. A USPTO é uma agência americana que concede patentes e registro de propriedade intelectual aos respectivos inventores ou empresas. A escolha da base da USPTO como fonte de informação se deu, pois grande parte das patentes ser depositada nesta base, sendo possível obter resultados mais abrangentes. Além disso, as patentes são válidas para o território americano, que é a maior potência mundial, onde as empresas concentram suas matrizes e filiais, havendo grande diversidade de mercado. Por fim, nesta base também existe a possibilidade de encontrar informações sobre patentes solicitadas e concedidas em campos separados, facilitando a busca.

As informações a respeito das patentes em análise foram obtidas na aba “USPTO Patent Application Full-Text and Image Database (AppFT)”, buscando o seguinte jogo de palavras: “biological” OR “biotechnological” - em todos os campos – AND “production” AND “hydrogen” ANDNOT “sulfide” ANDNOT “peroxide” – nos títulos, entre os anos de 2014 e 2019. A restrição em relação às palavras “sulfide” e “peroxide” se deve às numerosas patentes encontradas que tratavam de sulfeto de hidrogênio ou peróxido de hidrogênio.

As informações relativas às patentes já concedidas foram coletadas na aba “USPTO Patent Full-Text and Image Database (PatFT)”, buscando a mesma combinação de palavras citadas anteriormente, no período de 2014 a 2019.

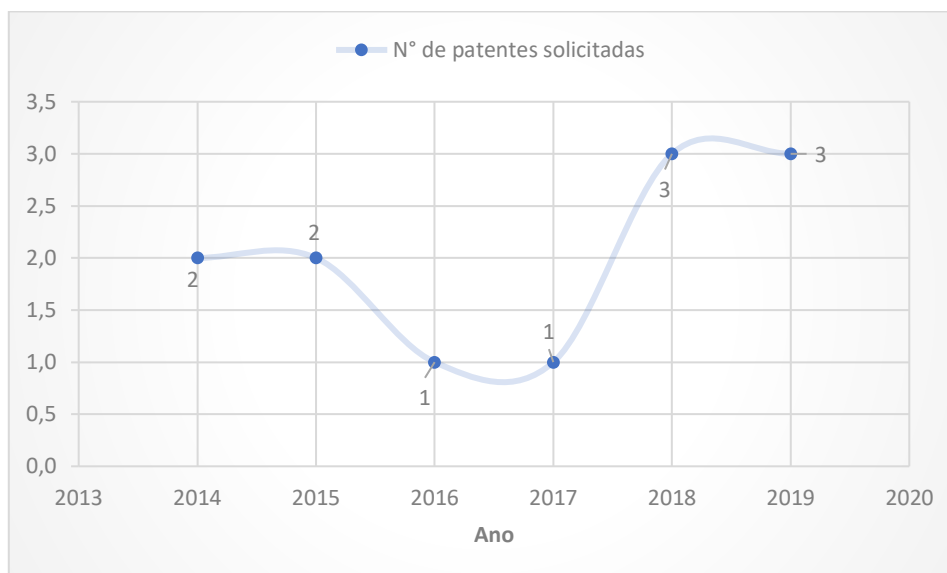
4.3.2 Patentes solicitadas

4.3.2.1 Análise Macro

Na busca de patentes em análise foram encontrados um total de 43 patentes, das quais percebeu-se posteriormente que 24 já haviam sido concedidas. Desta forma, as patentes já concedidas foram desconsideradas para esta análise.

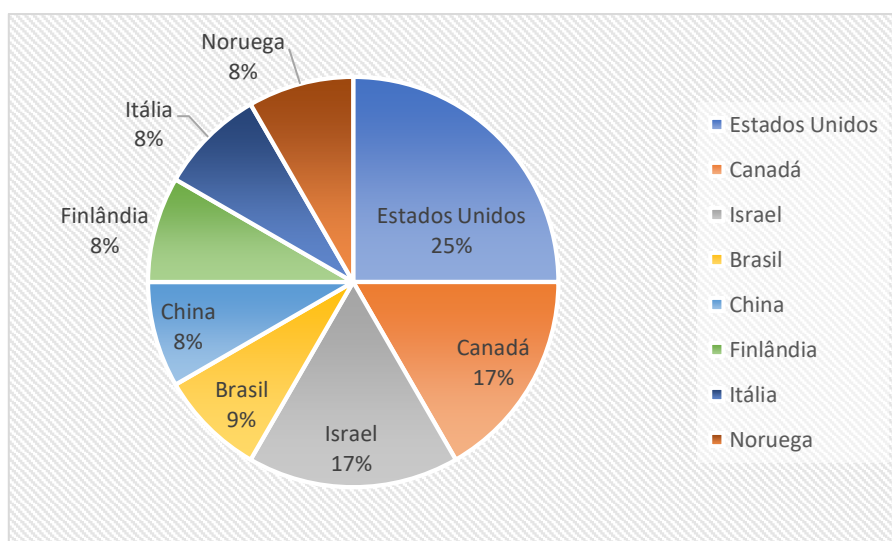
Das 20 patentes que foram consideradas, apenas 12 tratavam realmente de produção biológica de hidrogênio. As demais tratavam de outras formas de produção de hidrogênio ou de outros temas. Sendo assim, a seguinte análise foi baseada apenas nas 12 patentes ainda sob análise que tratam de bioprodução de hidrogênio.

Em relação a análise Macro, o primeiro indicador analisado foi o número de patentes sob análise de acordo com o respectivo ano de solicitação. No Gráfico 11 encontra-se a distribuição anual das patentes.

Gráfico 11. Quantidade de patentes solicitadas por ano.

De acordo com o Gráfico 11 é notável que os números anuais de patentes solicitadas relacionados ao tema abordado são baixos, atingindo seu máximo nos anos de 2018 e 2019 com três patentes cada.

Outra análise relevante em relação às patentes solicitadas são seus países de origem. No Gráfico 12 encontra-se a distribuição de por países de origem das patentes em análise selecionadas para esse estudo.

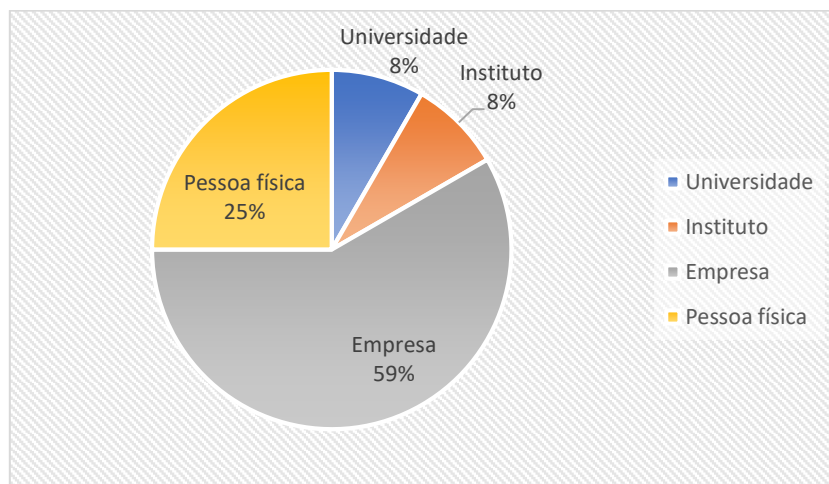
Gráfico 12. Distribuição percentual de patentes solicitadas em relação aos países de origem.

É possível observar que os Estados Unidos foram responsáveis por 25% das solicitações de patentes ainda sob análise, sendo o país com maior participação. Em seguida encontram-se Canadá e Israel estando presente 17% das patentes analisadas cada

um. Brasil, China, Finlândia, Itália e Noruega foram os demais países que também foram responsáveis pela solicitação de patentes, responsáveis por 8% do total.

Em relação às unidades solicitantes de patentes solicitadas abaixo, no Gráfico 13, encontra-se a distribuição de patentes em relação a universidades, institutos, empresas ou pessoas físicas.

Gráfico 13. Distribuição percentual de patentes solicitadas por organização.

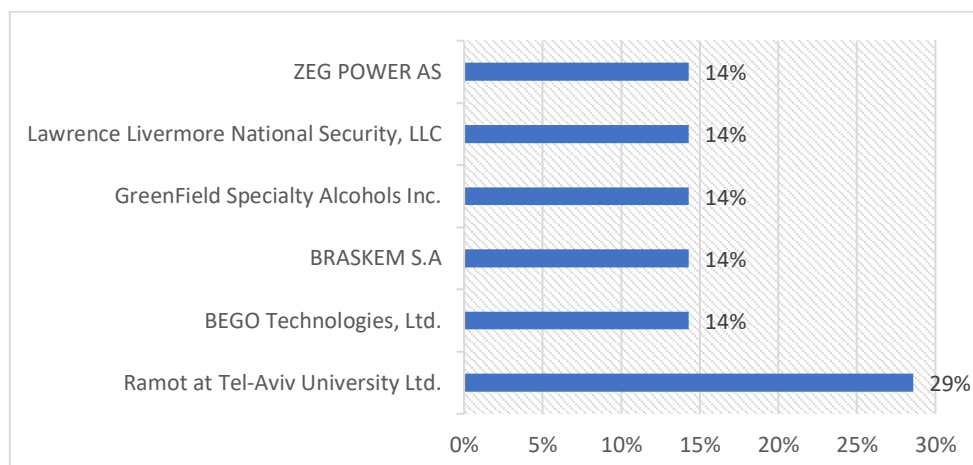


Analisando o Gráfico 13, é perceptível que empresas e companhias foram responsáveis por grande parte das solicitações de patentes, 59% delas, mais precisamente. Nas patentes temos a especificidade que pessoas físicas também se intitulam como entidades responsáveis por elas. Pessoas físicas foram responsáveis por um quarto das solicitações, enquanto universidades e institutos solicitaram 8% das patentes analisadas, cada.

Ao contrário do que ocorreu com a análise de artigos, onde a participação das empresas e companhias foi ínfima, na análise de patentes solicitadas elas tiveram uma presença bastante expressiva. Mostrando os diferentes padrões que podem ocorrer em diferentes fontes de informação.

No Gráfico 14 encontram-se dispostas todas as empresas solicitantes de patentes encontradas e suas respectivas parcelas de solicitações. Foram encontradas seis empresas solicitantes no total.

Gráfico 14. Distribuição percentual de patentes solicitadas de acordo com as empresas solicitantes.



Ramot at Tel-Aviv University Ltd. foi a empresa com maior percentual de participação nas solicitações de patentes solicitadas, alcançando 29% do total. Ela é uma empresa de Israel que executa projetos criados na *Tel-Aviv University*, visando a elaboração de produtos. As patentes solicitadas relativas a esta empresa abordavam processos fotocatalíticos para produção de hidrogênio a partir de cianobactérias.

A empresa brasileira Braskem, esteve presente entre as empresas solicitantes de patentes, chegando a um percentual de 14% em relação ao total. Sua respectiva patente abordava a utilização de um microrganismo que codifica polinucleotídeos para produção de uma enzima que catalisa a fermentação, produzindo terpeno, succinato e hidrogênio.

As demais empresas *Lawrence Livermore National Security LLC*. (localizada nos Estados Unidos), *ZEG POWER AS* (na Noruega), *GreenField Specialty Alcohols Inc.* (no Canadá), e *BEGO Technologies Ltd.* (na China), também foram responsáveis por 14% das publicações, cada.

Os Institutos apresentaram apenas 2 representantes como solicitantes de patentes solicitadas: *Centre De Recherche Industrielle du Quebec (CRIQ)* e *Institut National De La Recherche Scientifique*, ambos localizados no Canadá. Dentre as Universidades, apenas uma foi encontrada como solicitante de patente ainda pendente, a *University of California*, localizada nos Estados Unidos.

4.3.2.2 Análise Meso

Apenas duas taxonomias foram criadas para categorizar as patentes em análise avaliadas por meio do mapeamento tecnológico: Processos e Biotecnologia e Engenharia Bioquímica. A Tabela 5 contém as taxonomias, suas respectivas descrições e o número

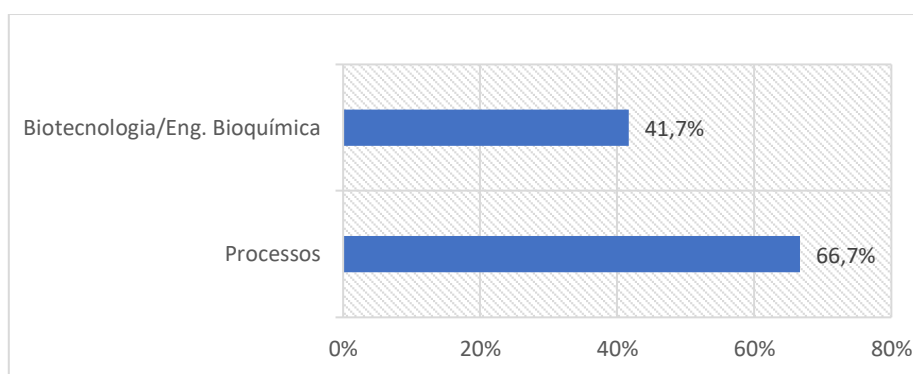
de patentes relativos a cada grupo. Vale mencionar que cada patente pode ser enquadrada em mais de uma classificação.

Tabela 5. Descrição e quantificação das taxonomias da análise Meso das patentes solicitadas analisadas no mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de artigos</i>
1	Processos	Alteração, comparação, simulação, execução ou análise do processo produtivo biológico de H ₂	8
2	Biotecnologia e Eng. Bioquímica	Estudo de formas de “engenheirar” ou aprimorar tecnologicamente os processos bioquímicos envolvidos na produção de H ₂	5

No Gráfico 15 estão dispostas as distribuições de patentes solicitadas em relação às taxonomias adotadas na análise Meso.

Gráfico 15. Distribuição de taxonomias da análise Meso em relação às patentes solicitadas utilizadas para o mapeamento tecnológico.



A taxonomia Processos foi o grupo com o maior número de patentes, assim como na análise de artigos, representando aproximadamente 67% do total de patentes solicitadas analisadas. Seguida pela taxonomia Biotecnologia e Eng. Bioquímica, que apresentou 42% das patentes como componentes de seu grupo.

4.3.2.3 Análise Micro

4.3.2.3.1 *Processos*

Todas as patentes da taxonomia Processos citavam em algum ponto o processo produtivo e por isso todas fazem parte da Micro Produção. Porém, uma das patentes, além

do processo produtivo, também mencionava uma metodologia de separação de gases para se obter um produto mais puro ao final do processo. Na Tabela 6 estão dispostos os subgrupos contidos na taxonomia Processos.

Tabela 6. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Processos das patentes solicitadas analisadas do mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de artigos</i>
1	Produção	Alteração, comparação ou execução de metodologias de produção biológica de H ₂	8
2	Purificação e Separação	Recuperação ou purificação do H ₂ produzido biologicamente	1

- Produção

Todas as patentes presentes na Micro Produção citavam processos fermentativos. Duas destas citam glicerol como matéria-prima, uma descreve o processo produtivo para se ter etanol e H₂ como produto, outro consiste em melhorar a produção de H₂, adicionando o mesmo volume de glicerol que será retirado de meio fermentativo, mantendo o volume constante. Sobre a fermentação também foram descritos métodos para solucionar problemas de contaminação por bactérias metenogênicas e *wash-out* da cultura microbiana, e para aumentar a produção de metano adicionando H₂ em uma das etapas.

Também foram citados sistemas fotocatalíticos, com cianobactérias, e bioeletroquímicos, com H₂ como subproduto da produção de óxido de grafeno, porém não foram fornecidos muitos detalhes.

- Purificação

Apenas uma patente foi enquadrada nesta Micro. Ela trata da separação do CO₂ produzido a partir da fermentação anaeróbia juntamente com o hidrogênio e o CH₄. A separação é feita utilizando o CaO como absorvente de CO₂, que é posteriormente recuperado no processo.

4.3.2.3.2 *Biotecnologia e Engenharia Bioquímica*

Na taxonomia Biotecnologia e Engenharia Bioquímica todas as patentes apresentaram assuntos relacionados a Biodesign, grande parte tratando de modificação de microrganismos.

- Biodesign

Em grande parte dos artigos foram abordadas modificações biológicas. Foram citados microrganismos geneticamente modificados para codificar: hidrogenases e proteínas de maturação que contribuiriam para a produção de H₂, enzimas para catalisar a conversão de fontes de carbono a H₂, e nitrogenase para aumentar a produção de H₂. Também é reportado um polipeptídeo envolvido na produção biológica de hidrogênio, como codifica-lo e um método de produção utilizando-o.

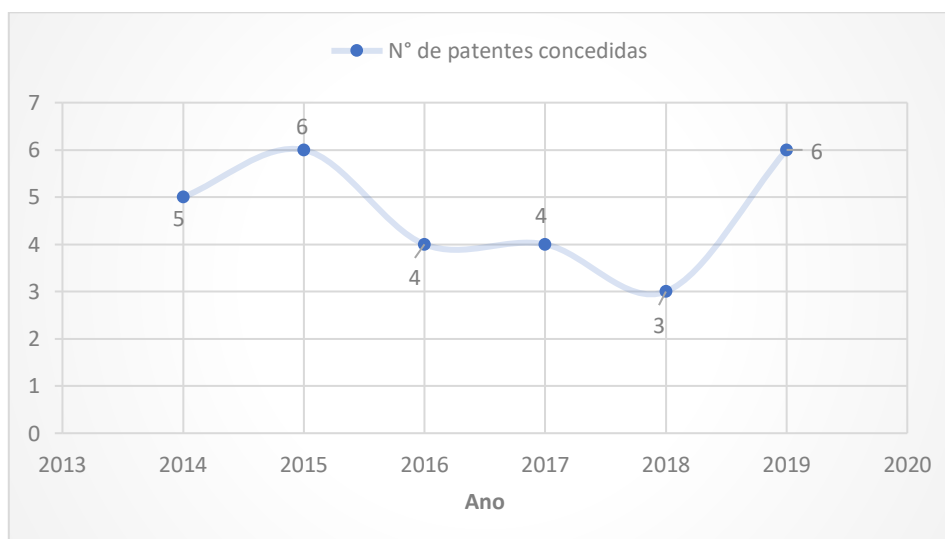
4.3.3 Patentes concedidas

4.3.3.1 Análise Macro

A partir da busca da combinação de palavras de acordo com o descrito na metodologia, foram encontradas um total de 45 patentes concedidas. Destas, 17 não tratavam do tema de interesse. Sendo assim, as análises para compor o mapeamento tecnológico foram realizadas com base nas 28 patentes restantes que tinham como tema a produção biológica de hidrogênio.

Em relação à análise Macro, abaixo encontra-se o Gráfico 16, que dispõe a distribuição das 28 patentes analisadas de acordo com seus anos de concessão.

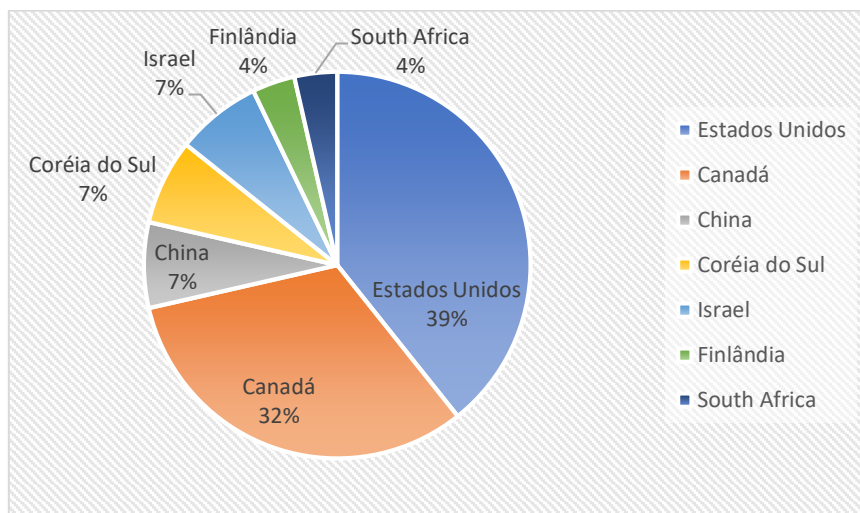
Gráfico 16. Quantidade de patentes concedidas relacionadas à produção biológica de hidrogênio por ano.



Observando-se o Gráfico 16, é percebe-se que as quantidades de concessões de patentes, no período entre os anos de 2014 e 2019, variaram de 6 a 3 patentes. Apresentando seu máximo nos anos de 2015 e 2019, e seu mínimo no ano de 2018.

Um indicador importante a ser também analisado é a disposição de concessão de patentes de acordo com seu país de origem (Gráfico 17).

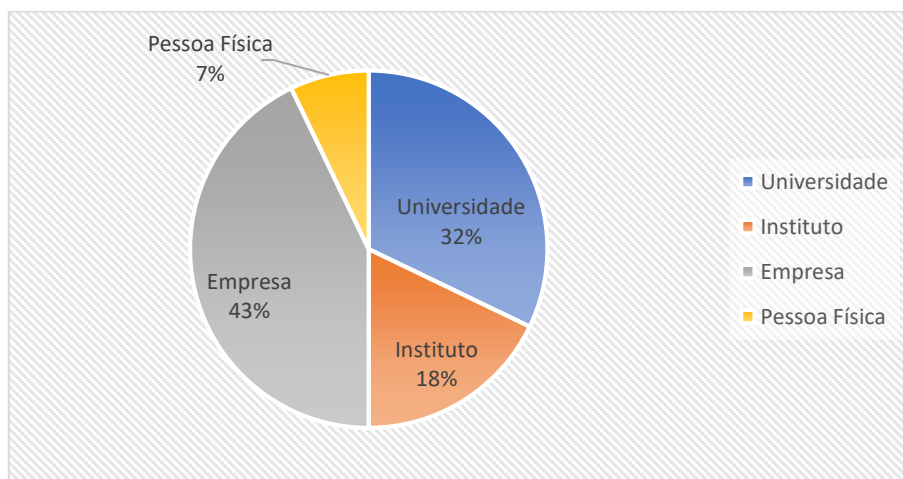
Gráfico 17. Distribuição percentual de patentes concedidas em relação aos países de origem.



Assim como na distribuição de patentes solicitadas, Estados Unidos e Canadá apresentam os maiores percentuais de patentes concedidas, representando respectivamente 39% e 32% do total de patentes utilizadas para análise. Outros países que se repetem nessa análise são China e Finlândia, sendo China a origem de 7% das patentes concedidas, juntamente com Coreia do Sul e Israel, e a Finlândia responsável por 4% destas, juntamente com a África do Sul.

Também é importante avaliar quais são as entidades envolvidas nas solicitações das patentes já concedidas. O Gráfico 18 dispõe essas informações relativas ao período analisado.

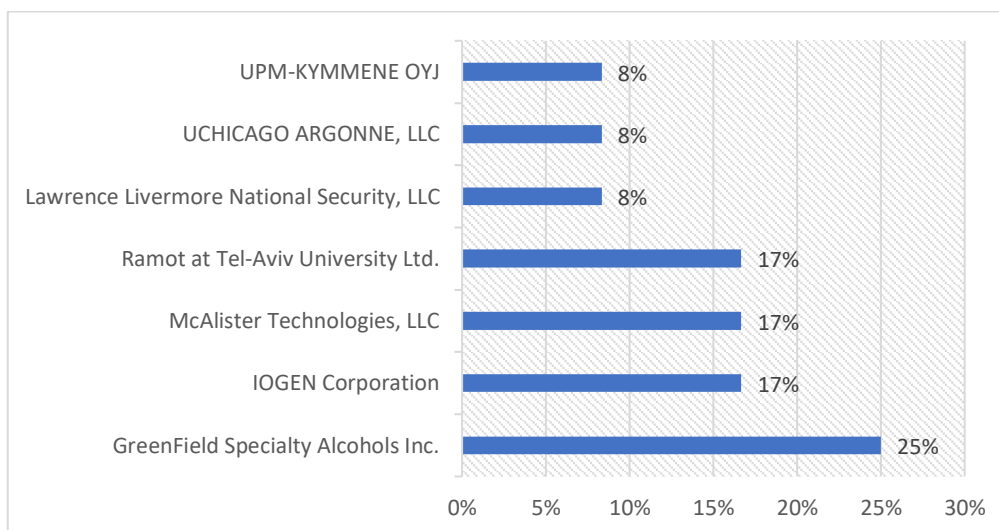
Gráfico 18. Distribuição percentual de patentes concedidas por tipo de solicitante.



Considerando o que foi exposto no Gráfico 18, percebe-se que as empresas apresentaram números mais expressivos nas solicitações de patentes concedidas (43%), repetindo o comportamento performado na análise de patentes solicitadas. Por outro lado, no presente caso, as pessoas físicas apresentaram o menor quantitativo de patentes, representando apenas 7% do total de arquivos analisados. As Universidades e Institutos representaram 32% e 18% das solicitações, respectivamente.

No Gráfico 19 encontram-se as empresas presentes nas análises relacionadas às patentes concedidas. Estiveram presentes sete empresas.

Gráfico 19. Distribuição percentual de patentes concedidas de acordo com as Empresas solicitantes.



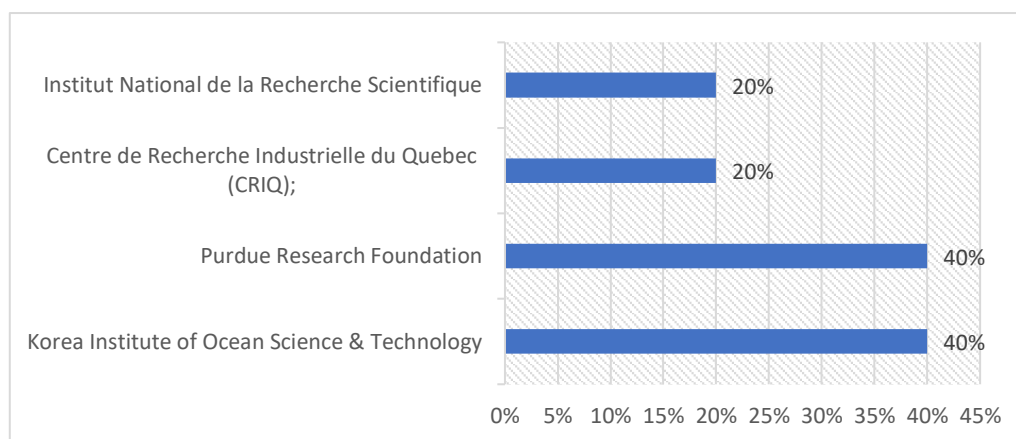
GreenField Specialty Alcohols Inc., já citada anteriormente, é empresa que possui maior quantitativo de patentes concedidas, responsável por 25% delas. Ela é uma empresa

canadense especializada na produção de álcoois, principalmente etanol. As patentes concedidas a esta empresa tratavam sobre a produção eletro-assistida de hidrogênio a partir de matéria orgânica. Em 2019, a *GreenField Specialty Alcohols Inc.* anunciou uma *joint venture* com a empresa *Hy2gen* para a produção verde de hidrogênio por eletrólise em escala industrial.

Ramot at Tel-Aviv University Ltd., já mencionada, *McAllister Technologies LLC* (localizada nos Estados Unidos) e *IOGEN Corporation* (no Canadá) foram responsáveis por 17% das patentes já concedidas. *Lawrence Livermore National Security LLC*, também já mencionada, *UPM-KYMMENE OYJ* (no Canadá) e *UCHICAGO ARGONNE LLC* (nos Estados Unidos) publicaram 8% das patentes, cada.

No Gráfico 20 encontram-se as informações relativas a todos os Institutos responsáveis pelas patentes concedidas, totalizando quatro solicitantes.

Gráfico 20. Distribuição de patentes concedidas de acordo com os Institutos.



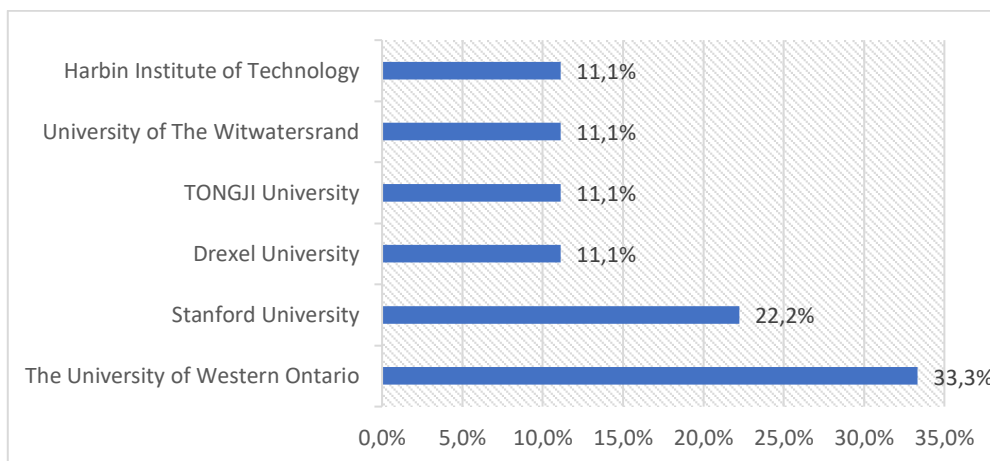
Purdue Research Foundation foi responsável por 40% das publicações, é uma organização de fins não-lucrativos localizada nos Estados Unidos. As patentes abordavam a produção biológica de hidrogênio por um sistema anaeróbio, a partir de resíduos orgânicos.

Korea Institute of Ocean Science & Technology também estava presente em 40% das concessões de patentes. Suas patentes citavam a utilização do microrganismo *Thermococcus onnurineus* para a otimização e produção de hidrogênio.

Os demais institutos *Institut National de la Recherche Scientifique* e *Centre de Recherche Industrielle du Quebec (CRIQ)* tiveram participação conjunta e foram responsáveis por 20% das patentes concedidas.

Ao todo foram encontradas seis universidades relacionadas às patentes concedidas. As informações encontram-se organizadas no Gráfico 21.

Gráfico 21. Distribuição percentual de patentes concedidas de acordo com as Universidades.



A universidade que apresentou em quantidades mais expressivas foi a *University of Western Ontario*, com 33,3% do total de patentes concedidas. As patentes abordam sistemas de produção de hidrogênio e metano a partir de resíduos orgânicos e biomassa.

Stanford University, renomada universidade dos Estados Unidos, foi responsável por 22,2% das patentes. As demais, *University of the Witwatersrand* (da África do Sul), *TONGJI University* (da China), *Drexel University* (dos Estados Unidos) e *Harbin Institute of Technology*, já citado anteriormente, representam 11,1% das concessões, cada.

4.3.3.2 Análise Meso

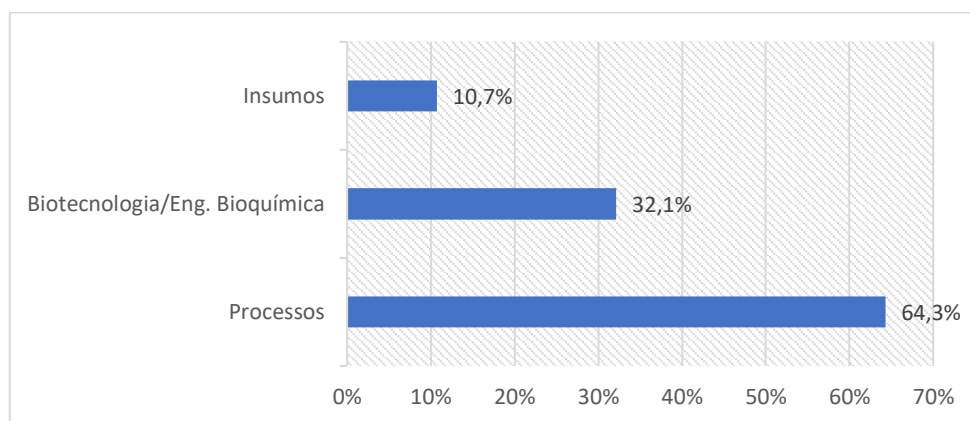
Para categorizar as patentes já concedidas foram criadas três taxonomias de acordo com o assunto abordado na patente. As descrições das taxonomias e suas respectivas quantidades encontram-se dispostas na Tabela 7. Vale ressaltar que cada patente pode estar presente em mais de um grupo.

Tabela 7. Descrição e quantificação das taxonomias da análise Meso das patentes concedidas analisadas no mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de patentes</i>
1	Processos	Alteração, comparação, simulação, execução ou análise do processo produtivo biológico de H ₂	18
2	Biotecnologia e Eng. Bioquímica	Estudo de formas de engenheirar ou aprimorar tecnologicamente os processos bioquímicos envolvidos na produção de H ₂	9
3	Insumos	Avaliação do comportamento ou da influência dos insumos na produção biológica de H ₂	3

O Gráfico 22 disponibiliza a informação das quantidades relativas a cada grupo de taxonomia de patentes concedidas consideradas na análise.

Gráfico 22. Distribuição percentual de taxonomias da análise Meso em relação às patentes concedidas utilizadas para o mapeamento tecnológico.



Assim como nas análises dos artigos e das patentes solicitadas, a taxonomia Processos foi a mais expressiva dentre os grupos formados pelas patentes já concedidas, sendo responsável por aproximadamente 64% do total. Em seguida, apresentando aproximadamente metade da participação da anterior, a taxonomia Biotecnologia e Eng. Bioquímica esteve presente em 32% das patentes concedidas. Por fim encontram-se o grupo de Insumos, representando aproximadamente 11% do total, respectivamente.

4.3.3.3 Análise micro

4.3.3.3.1 Processos

A taxonomia Processos foi a mais expressiva dentre as patentes analisadas, sendo o tema mais abordado. Ela foi subdividida em outros dois grupos: Produção e Otimização, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Processos das patentes concedidas analisadas no mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de artigos</i>
1	Produção	Alteração, comparação ou execução de metodologias de produção biológica de H ₂	17
2	Otimização	Estudo da variação de parâmetros analíticos visando a maximização da produção biológica de H ₂	3

O tema Produção esteve presente em todas as patentes presentes na taxonomia Processos, sendo que aproximadamente 18% das patentes também abordava a Micro Otimização.

- Produção

Primeiramente, a taxonomia Produção esteve presente em todas as patentes concedidas de grupo. Dentre essas patentes, o tema mais abordado foi a produção integrada de hidrogênio e metano; algumas citavam produção contínua em biorreator tipo CSTR. Em outros casos foram mencionados biorreatores eletro assistidos, onde em um dos casos houve descrição de todo processo produtivo. Uma das patentes abordou diversas metodologias e processos para a produção biológica de hidrogênio. Foram citados processos que visavam a recuperação da biomassa residual do meio fermentativo, rica em cultura microbiana, para reutilização no processo. Um biorreator para operação em cultura mista de bactérias termofílicas, e um complexo produtivo para a utilização de cianobactérias também foram mencionados.

- Otimização

A Micro Otimização continha apenas três patentes as quais tinham por objetivo aumentar a produção de hidrogênio com base na alteração de algum parâmetro do processo. Uma das estratégias adotadas em um dos documentos citava a técnica de

feedback, onde havia a remoção de uma porção do hidrogênio produzido e outra porção era reciclada para o reator com o objetivo de aumentar o rendimento. Outros métodos utilizados foram a adoção de um pré-tratamento de radiação ultravioleta das águas residuais utilizadas como fonte de carbono, seguida de condições de pH neutro e temperatura intermediária. Além disso, também foi mencionado o uso de uma proteína de fusão que contribuía para a aumentar a produção de hidrogênio.

4.3.3.3.2 *Biotecnologia e Engenharia Bioquímica*

A taxonomia Biotecnologia e Eng. Bioquímica foi o segundo assunto mais discutido dentre as patentes analisadas. Nela, todas as patentes discutiam assuntos relacionados a Biodesign dos microrganismos, ou modificação de fatores que alteram a produção de hidrogênio.

- **Biodesign**

Foram abordadas possibilidades de como co-fatores e proteínas influenciam na produção de hidrogênio; também foi citada a utilização de uma proteína sintética em um processo fotocatalítico. Foram discutidas a utilização de microrganismos mutantes para a produção de H₂ a partir de formato, e para expressar uma enzima hidrogenase, que contribui para a maior produção de hidrogênio. Outra questão abordada foi o aumento da produção de hidrogênio de acordo com o aumento da expressão de um determinado gene de um microrganismo específico. Algas transgênicas, produzidas por indução da produção de genes exógenos por manipulação de fatores ambientais, também foram citadas nas produções fotobiológica de H₂.

4.3.3.3.3 *Insumos*

A taxonomia Insumos foi subdividida em duas Micros: Microrganismos e Inóculos, e Matérias-primas, de acordo com as informações dispostas na Tabela 9.

Tabela 9. Descrição e quantificação dos subgrupos da análise Micro da taxonomia Insumos das patentes concedidas analisados no mapeamento tecnológico.

<i>Nº</i>	<i>Taxonomia</i>	<i>Descrição</i>	<i>Nº de artigos</i>
1	Microrganismos e Inóculos	Investigação dos microrganismos ou inóculo que participam da produção biológica de H ₂	3
2	Matérias-primas	Análise da influência da composição e da viabilidade da utilização de determinadas biomassas como matéria-prima para a produção de H ₂	1

O tema Microrganismos e Inóculo esteve presente em todas as patentes presentes na taxonomia Insumos, sendo que aproximadamente 33% das patentes também abordava a Micro Matérias-primas.

- **Microrganismos e Inóculos**

Na taxonomia Microrganismos e Inóculo estão presentes em três patentes concedidas. Uma das patentes abordava uma metodologia de produção de hidrogênio com *E. harbinense*, uma bactéria anaeróbia restrita, e com *P. aeruginosa*, uma bactéria anaeróbia facultativa, a fim de reduzir a competição entre as bactérias. Foram abordadas estratégias para driblar problemas relacionados aos inóculos que são enfrentados durante a produção sequencial de hidrogênio e metano, como: contaminação da cultura de bactérias e *washout* da comunidade microbiana. Também foi citada a produção fotocatalítica a partir de cianobactérias.

- **Matérias-primas**

A Micro Matérias-primas, possui apenas um componente, que discorre sobre diversas metodologias de produção de hidrogênio, focadas na utilização de rejeitos orgânicos como fonte de carbono.

4.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS DO MAPEAMENTO

Com a análise dos artigos científicos, foi perceptível que nos últimos anos, principalmente a partir de 2004, o interesse em estudos sobre a produção biológica de hidrogênio se encontra em crescimento. Grande parte dos artigos trata de assuntos como

energia e meio ambiente, e alguns tratam de ambos, evidenciando a preocupação ambiental e o interesse do uso do hidrogênio como combustível.

As principais instituições responsáveis pelas publicações dos artigos foram as universidades, seguidas pelos institutos. As empresas apresentaram uma participação bastante reduzida na publicação de artigos. *Harbin Institute of Technology* e *Henan Agricultural University*, foram as universidades com mais destaque nas publicações de artigos, ambas localizadas na China, que foi o país com a maior quantidade de artigos publicados sobre a bioprodução de hidrogênio. Dentre os representantes brasileiros, a Universidade Federal de Uberlândia foi a que mais se destacou, com estudos sobre consórcios microbianos envolvidos na produção de hidrogênio.

Os principais temas discutidos nos artigos foram: os processos envolvidos na produção de hidrogênio, com principal foco na metodologia da produção e na otimização dos parâmetros e variáveis utilizados, e o insumos envolvidos, abordando tanto as fontes de carbono como os inóculos utilizados na produção.

As patentes apresentam um padrão diferentes dos artigos. Primeiramente já se pode perceber o número bastante inferior de patentes disponíveis se comparados aos números de artigos. Isso indica que apenas uma pequena parte da tecnologia desenvolvida até o momento estará disponível em uma escala de médio a curto prazo. A grande maioria ainda se encontra na fase inicial, estudo acadêmico, representados pelos artigos científicos. Um fato que contribui para este pensamento é o considerável número de artigos de avaliação de viabilidade econômica analisados, corroborando com a lógica de análise inicial de mercado.

Ao contrário do padrão apresentado pelos artigos, a maioria das patentes foi depositada por empresas, sendo seguido pelas universidades e os intitutos a minoria. Os principais responsáveis pelas patentes concedidas foram a universidade *University of Western Ontario* e as empresas *GreenField Specialty Alcohols Inc.*, produtora de etanol que formou recentemente uma *joint-venture* para a produção de hidrogênio verde, e *Ramot at Tel-Aviv University Ltd.* que é responsável pelas aplicações e transferências de tecnologia da *Tel Aviv University*. O país que mais contribuiu para o depósito de patentes foi o Estados Unidos, seguido pelo Canadá, o que está diretamente relacionado às contribuições das instituições canadenses *GreenField Specialty Alcohols Inc.* e *University of Western Ontario*.

As patentes também apresentaram os processos produtivos como os temas mais abordados, com foco principal nas metodologias de produção e rotas metabólicas. Porém

as patentes também abordavam a discussão no desenvolvimento biotecnológico envolvido na bioprodução de hidrogênio, abordando principalmente modificações biológicas, atuação em microrganismos, enzimas, proteínas, etc, como forma de beneficiar a produção.

Tanto os artigos como as patentes convergem na abordagem de temas relacionados ao processo de bioprodução de hidrogênio. Assuntos como fermentação, reatores e produção integrada com metano foram discutidos por ambas partes. Por outro lado, enquanto os artigos mantiveram o debate também em otimização dos parâmetros dos processos, as patentes focaram no desenvolvimento biotecnológico da produção.

Em ambos os casos, a produção biológica de hidrogênio se mostra uma potencial tecnologia para o futuro, mostrando assim a importância de estudos que a abordem, promovendo seu desenvolvimento através do conhecimento.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

As sementes de açaí utilizadas neste estudo foram doadas pela empresa Açaí Amazonas Ltd, localizada na cidade de Óbidos, no estado do Pará. A semente foi previamente moída em um moinho de facas WILEY MILL® e posteriormente peneirada considerando uma granulometria de 180 µm a 850 µm. A partir da semente moída, foram produzidos os hidrolisados da semente de açaí, ricos em açúcares, os quais foram utilizados como fonte de carbono nas fermentações realizadas neste estudo.

Lodo anaeróbio proveniente de estação de tratamento de esgoto, localizado no bairro da Penha no Rio de Janeiro (RJ), foi utilizado como fonte de microrganismos para a fermentação. Os lodos eram coletados preferencialmente dos digestores da estação de tratamento. Foram utilizados três lotes diferentes de lodo neste trabalho, sendo nominados como L1, L2 e L3, que foram armazenados em galões de 5 e 10 L e mantidos sob resfriamento.

5.2 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO DA SEMENTE DE AÇAÍ (HSA)

O HSA foi obtido através da hidrólise ácida da semente de açaí. Foi seguida a metodologia adaptada descrita por Monteiro *et al.* (2019), que testou diferentes condições de hidrólise ácida da semente de açaí, e determinou uma condição apropriada para obter um hidrolisado rico em manose. A semente de açaí moída foi incubada com H₂SO₄ 3% (m/m) em autoclave por 60 min a 121 °C. Para tal, em frascos Schott de 1,0 L, foram adicionados 18,75 g de massa seca de semente de açaí moída e 75 mL de ácido, mantendo a proporção (massa de semente)/(volume de ácido) igual a 1:4.

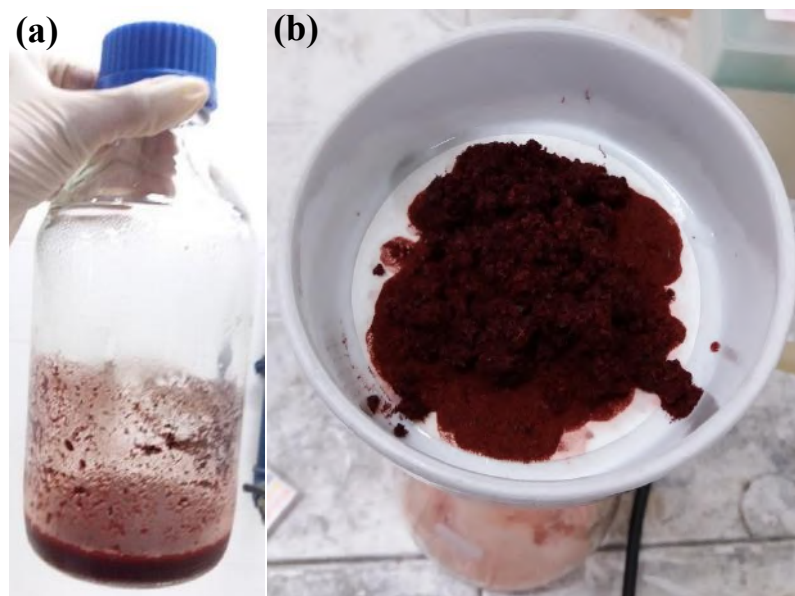
Ao fim da incubação, os frascos foram colocados em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. O conteúdo foi filtrado, separando a fração sólida, resíduo da semente hidrolisada, da fração líquida, o HSA (Figura 7). O HSA foi armazenado sob resfriamento e neutralizado com CaCO₃ para posterior caracterização da composição de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Foram obtidos três lotes diferentes de HSA, sendo chamados de HSA 1, HSA 2 e HSA 3.

Em paralelo, foi elaborado um meio sintético com o objetivo de mimetizar o HSA no meio fermentativo. Desta forma, para compor o meio mimetizado foram utilizados os

principais açúcares contidos no HSA (manose, glicose, xilose, galactose e arabinose) em concentrações similares às obtidas após a análise por CLAE.

Figura 7. Processo de obtenção do HSA: (a) produtos líquido e sólido da hidrólise após reação na autoclave; (b) resíduo sólido do processo após filtração.



5.3 PRÉ-TRATAMENTO TÉRMICO DO LODO ANAERÓBIO

Lodo anaeróbio foi utilizado como fonte de cultura microbiana mista para a realização da fermentação. Por vezes, se fazia necessária a concentração do lodo em cone de sedimentação para que fosse possível atender os padrões de padronização determinados para a fermentação (Figura 8.a).

O lodo anaeróbio foi previamente tratado com o objetivo de inativar as arqueas metanogênicas presentes no meio e evitar o consumo de H_2 . Foram realizados dois tipos de pré-tratamento térmico (Figura 8.b) de acordo com a condição de fermentação a qual o meio seria submetido: condições mesofílicas ou termofílicas.

Figura 8. Tratamento do lodo anaeróbio: (a) Concentração de sólidos do lodo em cone de sedimentação; (b) Sistema de pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio.



5.3.1 Condição mesofílica

O pré-tratamento foi conduzido submetendo o inóculo a 65°C em banho-maria durante 30 minutos (WONG, WU, *et al.*, 2014). Para realizar um aumento gradual de temperatura, foi realizada uma curva de aquecimento da água até 65°C e posteriormente adicionado o inóculo. O tempo de aquecimento foi cronometrado a partir do momento que o inóculo atingiu a temperatura desejada. Após o tratamento térmico, o frasco com o inóculo foi submetido a um banho de gelo até atingir temperatura ambiente.

5.3.2 Condição termofílica

O tratamento termofílico do inóculo foi seguido de acordo com o método de Wong e colaboradores (2014) adaptado. O inóculo foi tratado em banho-maria a 95°C durante 20 minutos. Também foi realizado um aumento gradual de temperatura, aquecendo a água até 95 °C e posteriormente adicionado o inóculo. Da mesma forma, após o tratamento, o frasco com o inóculo foi submetido ao banho de gelo até atingir temperatura ambiente.

5.4 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) E SÓLIDOS SUSPENSOS VOLÁTEIS (SSV)

A quantificação de demanda química de oxigênio (DQO) foi utilizada como estimativa para determinar a quantidade de matéria orgânica presente no HSA. Esta é uma alternativa mais rápida em relação a medida de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e, que neste caso, não retorna resultados muito destoantes, devido à baixa presença de substâncias inorgânicas oxidáveis no HSA.

A medida de sólidos suspensos voláteis (SSV) representa a quantidade de sólidos suspensos que foram volatilizados e incinerados após calcinação em mufla a 550 °C. Este parâmetro foi utilizado como estimativa para padronizar e quantificar a presença de massa microbiana no lodo anaeróbio, pois a quantidade de SSV é comumente utilizada como medida representativa da quantidade de matéria orgânica presente no meio.

A razão $DQO_{\text{substrato}}:SSV_{\text{inóculo}}$ foi utilizada neste estudo como medida para padronização da proporção e concentração de açúcares e microrganismos no meio fermentativo.

5.4.1 Demanda química de oxigênio (DQO)

Os procedimentos de determinação da DQO da fonte de carbono foram realizados de acordo com metodologia padrão descritas por APHA, AWWA, *et al.* (2005).

Em cada tubo de digestão foi adicionado 1 mL de solução padrão de dicromato de potássio 0,01667 M, 2,3 mL de solução ácida de sulfato de prata 10,12 gL⁻¹, na qual foi utilizado ácido sulfúrico (H₂SO₄) como solvente e, 1,7 mL de amostra. Os tubos foram adicionados a um digestor específico para DQO por 2 h a 150°C. Após a digestão, a DQO foi determinada por método colorimétrico, medindo a absorvância das soluções em comprimento de onda de 600 nm. Foram utilizadas soluções de biftalato de potássio em concentrações conhecidas para elaboração de uma curva-padrão que foi usada como referência para relacionar a medida da absorvância com o valor de DQO da amostra.

- Preparo da solução de dicromato de potássio

Aproximadamente 167 mL de H₂SO₄, 33,3 g de sulfato de mercúrio (HgSO₄) e 4,903 g de dicromato de potássio previamente seco a 150°C por 2 h foram adicionados a 500 mL de água. A mistura foi completamente dissolvida e resfriada até temperatura ambiente e, por fim, a solução foi diluída até completar 1000 mL.

5.4.2 Sólidos Suspensos

Os procedimentos de determinação do SSV do inóculo, lodo anaeróbio, foram realizados de acordo com metodologia padrão descritas por APHA, AWWA, *et al.* (2005). Com o auxílio de uma bomba de vácuo, um volume conhecido da amostra é filtrado utilizando uma membrana de microfibras de vidro Whatman®. A amostra filtrada e a membrana foram depositadas em um cadinho de cerâmica e o conjunto foi submetido a 105 °C por 12 h em estufa e, posteriormente pesado. Por fim, a amostra filtrada, a membrana e o cadinho foram submetidos a 550°C por 30 min em mufla e o conjunto foi novamente pesado. A quantidade de sólidos suspensos pode ser determinada de acordo com as equações 6, 7 e 8.

$$\text{Sólidos suspensos voláteis (SSV)} = \frac{P2 \text{ (g)} - P3 \text{ (g)}}{\text{Vol. de amostra (L)}} \quad (6)$$

$$\text{Sólidos suspensos totais (SST)} = \frac{P2 \text{ (g)} - P1 \text{ (g)}}{\text{Vol. de amostra (L)}} \quad (7)$$

$$\text{Sólidos suspensos fixos (SSF)} = \frac{P3 \text{ (g)} - P1 \text{ (g)}}{\text{Vol. de amostra (L)}} \quad (8)$$

onde:

P1 é a massa do cadinho,

P2 é a massa do cadinho mais a amostra e seca em estufa,

P3 é a massa do cadinho mais a amostra incinerada em mufla.

5.5 FERMENTAÇÃO

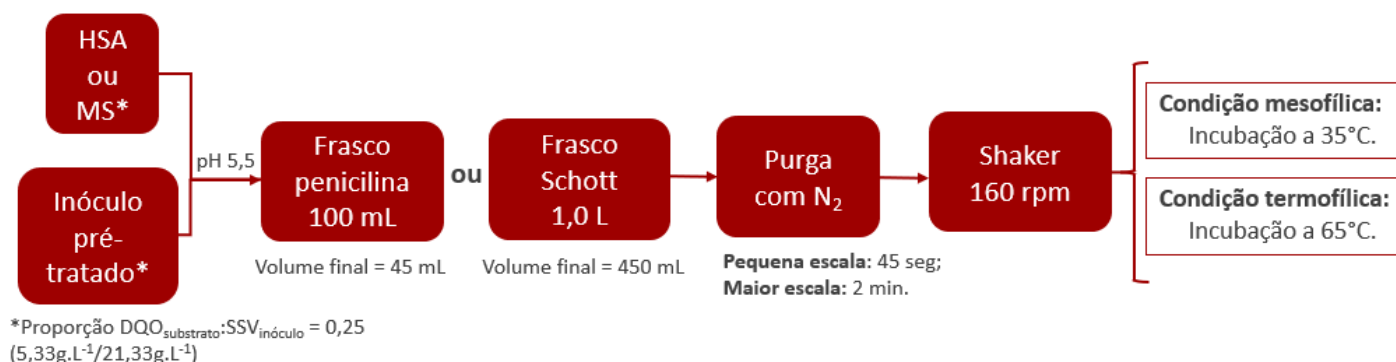
Para fins comparativos, os ensaios relativos à fermentação do HSA foram conduzidos em paralelo aos ensaios utilizando um meio sintético de composição de açúcares similar ao HSA.

A composição dos meios sintéticos utilizados neste estudo está descrita na Tabela 10. Cabe ressaltar que essas são as concentrações das soluções-mãe preparadas, que são diluídas para compor o meio fermentativo, de acordo com a concentração de açúcares desejada. As concentrações nos meios fermentativo em cada condição avaliada serão evidenciadas ao longo do texto.

Tabela 10. Composição de açúcares presentes nos meios sintéticos MS 1, MS 2 e MS 3.

<i>Componente</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>			<i>Concentração (mmol.L⁻¹)</i>		
	MS 1	MS 2	MS 3	MS 1	MS 2	MS 3
<i>Manose</i>	40,0	40,0	43,2	222,03	222,03	239,79
<i>Galactose</i>	3,7	-	0,1	22,65	-	0,67
<i>Xilose</i>	3,4	-	3,3	24,65	-	21,98
<i>Glicose</i>	2,6	10,0	2,3	14,43	55,51	12,77
<i>Arabinose</i>	2,0	-	1,2	13,32	-	7,99
Total	51,7	50,0	50,1	297,08	277,54	283,20

A metodologia do processo de fermentação adotada seguiu as etapas descritas na Figura 9.

Figura 9: Esquema da metodologia adotada para realização da fermentação.

5.5.1 Condição mesofílica

A fermentação em condições mesofílicas foi conduzida conforme a metodologia de Leitão (2018), em frascos penicilina de 100 mL (Figura 9). O volume final do meio fermentativo (Figura 9) foi de 45 mL nos frascos, onde foram utilizadas quantidades suficientes de lodo anaeróbio para atingir uma concentração de SSV de $21,33\text{ gL}^{-1}$. Foram utilizados meios sintéticos compostos por açúcares ou HSA como fonte de carbono. O meio sintético foi diluído de modo a se obter concentrações iniciais de açúcares de aproximadamente 3 gL^{-1} ou 5 gL^{-1} . Já o HSA foi diluído de forma a se ter uma concentração final de açúcares de aproximadamente 5 gL^{-1} , respeitando a proporção $DQO_{\text{substrato}}:SSV_{\text{inóculo}}$ de 1:4 ($5,33\text{ gL}^{-1}/21,33\text{ gL}^{-1}$).

O pH do meio fermentativo foi ajustado para 5,5 e os frascos penicilina de 100 mL que o continham foram purgados por 45 segundos com gás N₂ e, posteriormente, incubados a 35 °C com rotação em 160 rpm (LEITÃO, 2018).

5.5.2 Condição termofílica

A fermentação em condições termofílicas foi conduzida utilizando meio sintético (Figura 9). A diluição do meio sintético foi realizada conforme descrito na metodologia da condição de fermentação mesofílica, na seção 5.5.1. Foi utilizado o método de Leitão (2018) adaptando a temperatura de incubação para 65 °C. O pH do meio fermentativo (pH = 5,5), o tempo de purga dos frascos com N₂ (45 seg) e a rotação (160 rpm) se mantiveram os mesmos. O volume final do meio fermentativo também se manteve a 45 mL por frasco (Figura 10).

Figura 10. Meio fermentativo em frasco penicilina durante fermentação mesofílica ou termofílica de pequena escala.



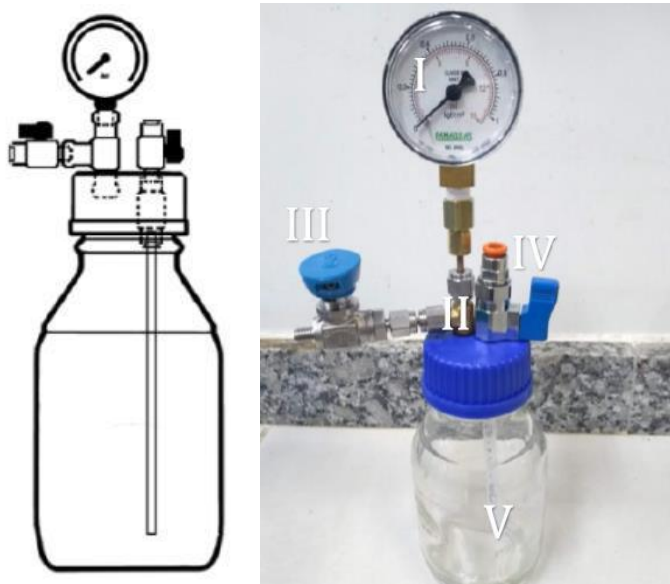
5.5.3 Aumento de escala da produção de hidrogênio (*scale-up*)

O *scale-up* foi realizado de forma a verificar a reprodutibilidade dos ensaios em maior escala e verificar quais eventuais problemas poderiam surgir com o aumento de escala. Foram realizados ensaios considerando recipientes e quantidade de meio fermentativo 10 vezes maiores que a escala de bancada para comparação dos resultados e verificação da viabilidade do processo.

O objetivo era performar um processo fermentativo em batelada, e para isso foram construídos minirreatores para atuação de forma similar ao biorreator ASBR, adaptando o método de agitação do meio fermentativo. Para estes ensaios foram utilizados os minirreatores (Figura 11) produzidos conforme descrito por Santana (2019). Os reatores

possuíam um manômetro, permitindo a tomada de pressão antes e após a produção de hidrogênio. Além disso, também possuíam saídas que possibilitavam a coleta de gás, para análise em cromatógrafo gasoso, e a coleta de líquido por meio de um tubo com a ajuda de uma seringa, sem proporcionar grandes alterações no sistema.

Figura 11. Esquema do biorreator em batelada. Em I - Manômetro, II – Conexão T, III – Válvula de gás, IV – Válvula de líquido, V – Tubo de extensão da saída de líquido.



Fonte: Santana (2019).

O *scale-up* foi realizado seguindo as condições mesofílicas, mas foram utilizados frascos Schott de 1,0 L ao invés de frascos penicilina de 100 mL (Figura 10). O volume final de meio fermentativo foi de 450 mL, respeitando a relação existente anteriormente. O tempo de purga foi aumentado para 2 minutos, com um fluxo de N_2 mais intenso. A relação $DQO_{\text{substrato}}:SSV_{\text{inóculo}}$, a rotação e o pH do meio foram mantidos, conforme adotado anteriormente.

Alguns fatores podem dificultar a ampliação de escala, como por exemplo, a tentativa de manter a similaridade dos frascos utilizados em pequena escala e maior escala. O controle de temperatura e grau de mistura deve ser realizado de forma mais rigorosa, já que é mais difícil manter estas condições quando se trabalha com maior volume de meio. Como os biorreatores pequenos, menores que 500 L, podem ser considerados bem misturados, apresentando comportamento de mistura completa, foi possível manter a rotação do frasco penicilina para o biorreator de 1,0 L. Além disso, também foi necessário desprender esforços para assegurar que não haveria vazamento no sistema de biorreator desenvolvido, já que este contava com muitas conexões não

existentes no sistema de pequena escala (válvulas, manômetros, etc), que deveriam ser isoladas de forma eficiente para evitar a perda de produto.

5.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS ORIUNDAS DA FERMENTAÇÃO

Durante a incubação, a produção de hidrogênio foi acompanhada utilizando um micro-cromatógrafo gasoso modelo 3000A da Agilent Technologies. Em determinados tempos de fermentação eram realizadas medidas para quantificar a presença de hidrogênio no meio. As colunas utilizadas foram HP-PLOT U (3 m x 0,32 mm x 30 μ m) e HP-PLOT Molecular sieve 5A (10 m x 0,32 mm x 12 μ m) à temperatura de 60 °C e 100 °C e os gases de arraste foram hélio e nitrogênio, respectivamente. Esta técnica foi utilizada para detectar os gases hidrogênio e dióxido de carbono.

Amostras líquidas do meio fermentativo foram coletadas em determinados tempos de incubação e analisadas por CLAE utilizando as colunas Aminex HPX-87H acoplada com uma pré coluna Carbo-H (Bio-Rad, USA) e uma pré-coluna *deashing* (Bio-Rad, USA) em um fluxo de 0,6 mL/min de fase móvel H₂SO₄ 0,05 M com temperatura de 55 °C; e Aminex HPX-87P acoplada a uma pré-coluna Carbo-P (Bio-Rad, USA) e uma pré-coluna *deashing* (Bio-Rad, USA) em um fluxo de 0,6 mL/min de água ultrapura como fase móvel e temperatura de 80 °C. Esta técnica foi utilizada para detectar os açúcares manose, glicose, arabinose, xilose e galactose, e os ácidos acético e butírico.

5.7 CÁLCULO DAS VARIÁVEIS DE RESPOSTA DO PROCESSO

Para quantificar o número de mols de hidrogênio produzidos foi utilizada a equação dos gases ideais para a realização dos cálculos (equação 9).

$$pV_h = nRT \quad (9)$$

Em que:

p é a pressão do sistema;

V_h é o volume do *headspace* do frasco;

n é o número de mols totais;

R é a constante universal dos gases;

T é a temperatura do gás;

A pressão do sistema foi considerada como a soma da pressão atmosférica (1 atm) com a pressão manométrica. No caso dos ensaios de aumento de escala, foram realizadas duas medidas de pressão manométrica, no início da fermentação e no tempo desejado, para calcular a quantidade de hidrogênio produzida. O cálculo de produção foi realizado de forma acumulada, englobando os pontos já obtidos. O volume do *headspace* foi o volume ocupado pelos gases no recipiente, 55mL para os ensaios em pequena escala com frascos penicilina e 550 mL para os ensaios em maior escala com frascos Schott. Foi utilizada a constante dos gases como $0,08205 \text{ atm.L.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e, a temperatura do gás como a temperatura de fermentação: $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (308 K) para as fermentações mesofílicas e $65 \text{ }^\circ\text{C}$ (338 K) para as fermentações termofílicas.

O rendimento de hidrogênio da reação foi calculado considerando sua produção e a concentração inicial de açúcares em mol (equação 10). A produtividade foi calculada considerando também o tempo de fermentação (equação 11). O volume específico foi calculado utilizando o volume do meio e o volume de H_2 produzido (equação 12).

$$Y_{p/s} = \frac{n_{\text{H}_2}}{n_{\text{carboidratos}}} \quad (10)$$

$$Q = \frac{Y_{p/s}}{t} \quad (11)$$

$$\text{Volume específico} = \frac{\text{volume de H}_2 \text{ produzido (mL)}}{\text{volume de meio fermentativo (mL)}} \quad (12)$$

Onde,

$Y_{p/s}$ é o rendimento da produção de H_2 ;

n_{H_2} é o número de mols de H_2 produzidos;

$n_{\text{carboidratos}}$ é o número de mols inicial de açúcares no meio fermentativo;

Q é a produtividade;

t é o tempo de fermentação.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DA SEMENTE DE AÇAÍ (HSA)

O HSA foi obtido seguindo a metodologia adotada por Leitão (2018), descrita no capítulo 4. O líquido obtido por hidrólise apresenta cor avermelhada, e pH na faixa extremamente ácido, cerca de 0,7.

Os ensaios iniciais foram conduzidos utilizando o HSA 1 obtido por Leitão (2018). Posteriormente, foram produzidos outros lotes de HSA, seguindo a mesma metodologia adotada por Leitão (2018). Para a análise dos novos lotes de HSA, as concentrações de ramnose e celobiose não foram avaliadas, já que apresentaram concentrações baixíssimas, consideradas desprezíveis, no HSA 1. A composição de açúcares dos HSA obtidos se encontra disponível na Tabela 11.

Analisando a caracterização dos hidrolisados, percebe-se que o HSA 3 apresentou divergências consideráveis na composição de açúcares em relação aos demais hidrolisados. A manose, por exemplo, apresentou redução de aproximadamente 45% de sua concentração em relação aos demais hidrolisados. As composições destoantes podem ser atribuídas a possíveis variações no processo ou equívocos operacionais cometidos no processo de obtenção do HSA 3, relacionados à concentração dos reagentes ou das condições operacionais.

Ao mesmo tempo, comparando-se HSA 1 e HSA 2, nota-se que é possível obter composições similares quando o procedimento de hidrólise é realizado na ausência de erros sistemáticos. Em ambos os casos foi identificada uma concentração de aproximadamente 50 gL^{-1} de açúcares totais no hidrolisado. Deste total, a manose era responsável por cerca de 40 gL^{-1} .

Embora o HSA 2 não tenha sido utilizado em nenhum dos ensaios presentes neste trabalho, sua composição foi inserida à título informativo, para evidenciar a reprodutibilidade de seu método de obtenção.

Mesmo apresentando concentrações de açúcares distintas, o HSA 3 manteve a proporção similar às dos demais hidrolisados, destoando apenas no percentual de glicose e arabinose. Com os resultados obtidos, pode-se afirmar que a manose é o açúcar majoritário na composição do hidrolisado, representando aproximadamente 77% dos açúcares, seguida por xilose e galactose, sendo cada um destes correspondentes a cerca de 7% do total de açúcares. Já a glicose e arabinose são os açúcares presentes em menores concentrações no hidrolisado.

Tabela 11. Caracterização do HSA 1 (lote 1), produzido no estudo de Leitão (2018), do HSA 2 (lote 1) e do HSA 3 (lote 3).

<i>Componente</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>			<i>Concentração (mmol.L⁻¹)</i>			<i>Concentração (%)</i>		
	HSA 1	HSA 2	HSA 3	HSA 1	HSA 2	HSA 3	HSA 1	HSA 2	HSA 3
<i>Manose</i>	39,92	38,57	21,40	221,59	214,09	118,79	77,3	76,9	77,6
<i>Xilose</i>	3,66	3,38	1,88	24,38	22,51	12,52	7,1	6,7	6,8
<i>Galactose</i>	3,45	3,73	2,24	22,98	24,85	14,92	6,7	7,4	8,1
<i>Glicose</i>	2,35	2,60	0,39	13,04	14,43	2,16	4,5	5,2	1,4
<i>Arabinose</i>	1,49	1,85	1,68	9,92	12,32	11,19	2,9	3,7	6,1
<i>Ramnose</i>	0,56	-	-	3,41	-	-	1,1	-	-
<i>Celobiose</i>	0,20	-	-	0,58	-	-	0,4	-	-
<i>Total</i>	51,63	50,13	27,59	295,91	288,21	159,58	-	-	-
<i>DQO</i>	70	85	61,3	-	-	-	-	-	-

Monteiro e colaboradores (2019) retrataram que apesar da semente de açaí possuir grandes concentrações de manana e glicana, apenas um percentual reduzido destes polímeros foi recuperado em forma de manose e glicose no hidrolisado. Por outro lado, constataram que houve alta recuperação de arabinose, xilose e galactose no hidrolisado. Este fato corrobora com a possibilidade das glicanas e mananas presentes na semente serem lineares e apresentarem estruturas recalcitrantes e cristalinas, que são resistentes aos ataques de ácidos diluídos, o que reduz sua recuperação no hidrolisado. Já galactoarabinosilanas são altamente suscetíveis a sofrer este tipo de ataque, podendo atingir 95% de rendimento na recuperação. Para aumentar a recuperação destes açúcares, Monteiro *et al* (2019) propôs a metodologia sequencial de hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática que atingiu 96,8% de rendimento na recuperação da manose.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO (INÓCULO)

Os lodos anaeróbios provenientes de estação de tratamento de esgoto foram utilizados como fonte microbiana de cultura mista para este estudo. Desta forma, também foi realizada a caracterização deste material para que pudesse ser padronizado e utilizado nos ensaios.

Os lodos anaeróbios foram caracterizados de acordo com suas respectivas concentrações de sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV). A informação mais relevante para este trabalho é a medida de SSV, que será utilizada como parâmetro para padronizar o lodo, como um reflexo da quantidade de cultura microbiana presente no inóculo.

Na Tabela 12 se encontram as informações de caracterização relativas aos lotes de lodo anaeróbio utilizados como cultura microbiana para a realização das fermentações.

Tabela 12. Caracterização dos lodos anaeróbios L1, L2, L3 e L4.

	<i>L1 (lote 1)</i>	<i>L2 (lote 2)</i>	<i>L3 (lote 3)</i>	<i>L4 (lote 4)</i>
<i>SST (g.L⁻¹)</i>	39,4 ± 2,2	30,8 ± 0,7	41,6 ± 0,8	36,3 ± 0,6
<i>SSF (g.L⁻¹)</i>	12,9 ± 0,8	10,4 ± 0,5	17,0 ± 0,8	15,9 ± 0,2
<i>SSV (g.L⁻¹)</i>	26,5 ± 1,5	20,4 ± 0,3	24,6 ± 0,0	20,4 ± 0,4
<i>pH</i>	7,12	7,36	7,32	-

Os lotes L2 e L4 possuíam concentrações de SSV menores que a desejada para realizar a fermentação segundo a metodologia apresentada. Nestes casos, buscou-se a mínima diluição do inóculo para que se aproximasse ao máximo do valor de SSV estabelecido no método ($21,33\text{gL}^{-1}$). Mesmo com quantidade de cultura microbiana reduzida, os resultados se mostraram satisfatórios.

6.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM CONDIÇÕES MESOFÍLICAS E TERMOFÍLICAS DE FERMENTAÇÃO

Os ensaios foram conduzidos com o objetivo de assegurar a viabilidade da produção de hidrogênio empregando meio sintético composto por açúcares. Buscou-se verificar diferenças no rendimento da produção conduzindo a fermentação com inóculo *in natura* e com inóculo pré-tratado termicamente. Além disso, a produção de hidrogênio foi avaliada em condições mesofílicas e termofílicas e em concentrações iniciais distintas de açúcares (cerca de $3,0\text{ gL}^{-1}$ e $5,0\text{ gL}^{-1}$) para avaliar a influência deste parâmetro no rendimento da produção.

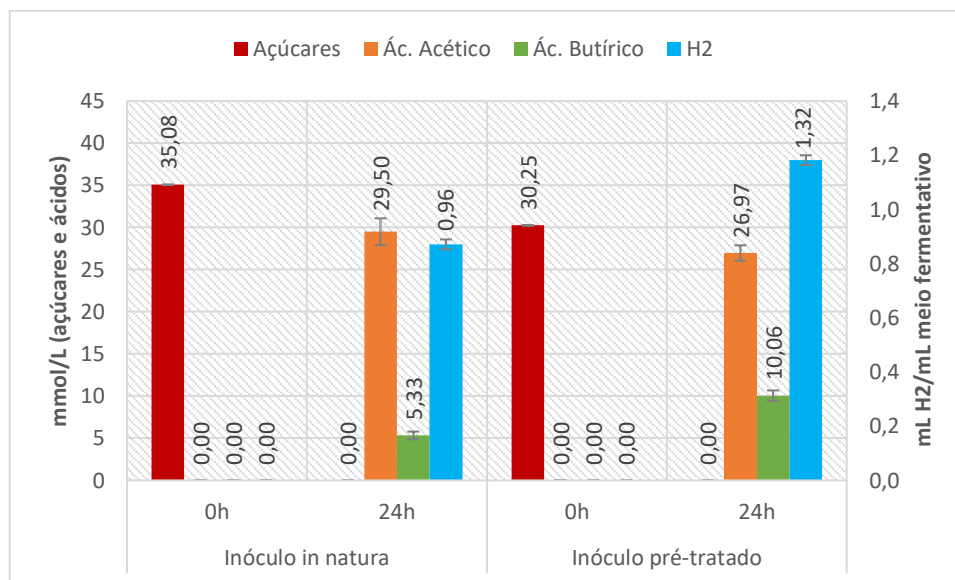
6.3.1 Pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio

Foram realizadas fermentações com meio sintético como fonte de carbono, buscando reproduzir a proporção de açúcares do HSA, em condições mesofílicas, para verificar a influência do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio. Nestes ensaios foi utilizado o lodo L1 e o meio sintético MS 1.

Leitão (2018), em condições similares de fermentação do HSA, testou dois tipos diferentes de pré-tratamento do lodo anaeróbio: térmico e ácido. O pré-tratamento térmico foi determinado como o tratamento mais efetivo e menos agressivo dentre os testados. Além disso, este tratamento não exigia tempo de aclimatação, podendo ser utilizado logo após o pré-tratamento, tornando o processo mais rápido. Por esses motivos, o pré-tratamento térmico foi escolhido como metodologia a ser seguida no presente estudo.

O Gráfico 23 retrata a concentração de açúcares, ácidos acético e butírico, e hidrogênio dos meios fermentativos, no início e após 24 h de fermentação, nos quais foram utilizados inóculos *in natura* ou termicamente tratados. A concentração inicial de açúcares no ensaio utilizando inóculo *in natura* foi de $6,3\text{ gL}^{-1}$ (35 mM). Já no ensaio com inóculo pré-tratado, a concentração inicial de açúcares foi de $5,4\text{ gL}^{-1}$ (30mM).

Gráfico 23. Quantificação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido butírico e hidrogênio no início e após 24 h de fermentação mesofílica utilizando inóculo *in natura* ou termicamente tratado em condições mesofílicas.



Analisando os dados, nota-se que mesmo nos ensaios em que o inóculo *in natura* foi utilizado, todo o açúcar do meio foi consumido, produzindo H₂, ácido acético e ácido butírico. A produção de hidrogênio em volume específico aumentou de 0,96 mL_{H2}/mL_{meiofermentativo}, no ensaio com inóculo *in natura*, para 1,32 mL_{H2}/mL_{meiofermentativo}, no ensaio com o inóculo pré-tratado.

Os ensaios nos quais foram utilizados os inóculos sem tratamento resultaram em um rendimento de 1,13 mol_{H2}/mol_{carboidrato} após 24 h de fermentação. Nos ensaios onde houve o tratamento térmico do lodo anaeróbico foi obtido um rendimento na produção de hidrogênio de 1,79 mol_{H2}/mol_{carboidrato} neste mesmo período de fermentação. Estes resultados indicam um aumento de aproximadamente 58% na produção do gás em relação ao ensaio que utilizou um inóculo sem nenhum tipo de pré-tratamento.

Os resultados apresentados são similares aos reportados por Leitão (2018), que em condições similares, utilizando razão DQO_{substato}/SSV_{inóculo} de 0,5, obteve 30% de aumento no rendimento ao realizar o pré-tratamento térmico, atingindo um rendimento de aproximadamente 1,78 mol_{H2}/mol_{carboidrato} em 24 h.

Foram produzidos 29,50 mM de ácido acético e 5,33 mM de ácido butírico em 24 h na fermentação com o inóculo *in natura*. Já no caso onde houve tratamento térmico, a produção de ácido acético e de ácido butírico foi de 26,97 mM e 10,06 mM, respectivamente. A produção de ácido butírico na fermentação com inóculo tratado se mostrou superior em comparação a produção do mesmo ácido no caso onde foi utilizado

o inóculo *in natura*, evidenciando uma maior preferência a rota butírica quando há o tratamento.

O maior rendimento e o maior volume específico obtidos no ensaio realizado com o lodo pré-tratado termicamente comprovam a eficiência desse tratamento na seletividade dos microrganismos responsáveis pela produção de hidrogênio. O aumento da temperatura provoca a inativação de alguns microrganismos consumidores de hidrogênio, o que, conseqüentemente, provoca um aumento no rendimento global de H₂.

6.3.2 Comparação da produção de hidrogênio em condições mesofílicas e termofílicas variando a concentração inicial de açúcares

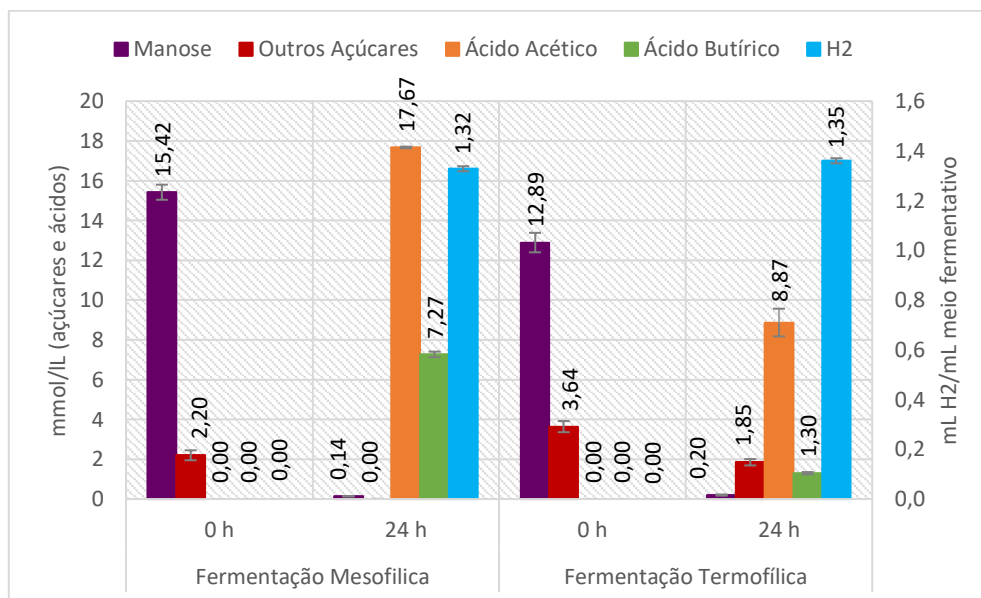
A partir deste tópico, todas as fermentações foram realizadas utilizando lodo anaeróbico termicamente tratado, sendo utilizadas condições mesofílicas ou termofílicas de pré-tratamento. A fermentação termofílica abrange temperaturas de fermentação e de tratamento do inóculo mais elevadas, entre 40°C e 65°C para a fermentação e 90°C e 100°C para o tratamento. Desta forma, foram seguidos os parâmetros detalhados no capítulo 4.

- **Concentração inicial de açúcares de aproximadamente 3gL⁻¹ no meio fermentativo**

A fermentação mesofílica foi conduzida utilizando lodo L2 como fonte de cultura microbiana e meio sintético MS 2. Já a fermentação termofílica foi conduzida utilizando lodo L2 e meio sintético MS 1. Os meios sintéticos MS 1 e MS 2 foram diluídos no meio fermentativo para concentração inicial de açúcares de aproximadamente 3gL⁻¹ (16,9 mM).

No Gráfico 24 encontram-se as concentrações de açúcares, ácidos acético e butírico e hidrogênio no início do ensaio e após 24 h de fermentação em condições mesofílicas e termofílicas.

Gráfico 24. Quantificação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido butírico e hidrogênio no início e após 24 h de fermentação mesofílica e termofílica com concentração inicial de açúcares de aproximadamente 3,0 gL⁻¹.



Não houve grande variação entre as duas condições de fermentação em relação ao volume específico de hidrogênio produzido após 24 h de inoculação, sendo alcançado um valor de 1,32 mL_{H2}/mL_{meiofermentativo}, em condições mesofílicas, e 1,35 mL_{H2}/mL_{meiofermentativo}, em condições termofílicas. Ambos os resultados estão de acordo com o resultado apresentado na seção 6.3.1, no ensaio que houve tratamento do inóculo (1,32 mL_{H2}/mL_{meiofermentativo}).

A diferença se deu no consumo de açúcares, cerca de 97% da manose e 100% da glicose foram consumidas em 24 h de fermentação em condições mesofílicas. Por outro lado, no mesmo tempo de fermentação, em condições termofílicas cerca de 98% da manose e 47% dos demais açúcares foram consumidos. Ou seja, a produção de hidrogênio foi semelhante em ambas condições de fermentação, mas houve um maior consumo de açúcares em condição mesofílica.

Após 24 h de fermentação mesofílica, o rendimento da produção foi de 2,94 mol_{H2}/mol_{carboidrato}, superior ao resultado do ensaio apresentado na seção 6.3.1 em condições similares (1,79 mol_{H2}/mol_{carboidrato}), no qual havia maior diversidade e concentração inicial de açúcares. Notou-se um aumento no rendimento da produção de hidrogênio em condições termofílicas para 3,24 mol_{H2}/mol_{carboidrato}, cerca de 10% superior aos resultados apresentados na fermentação mesofílica.

Em temperaturas mais altas ocorre o favorecimento termodinâmico das reações bioquímicas envolvidas no processo fermentativo, este pode ser um dos motivos pelo qual o rendimento da produção de hidrogênio se mostrou maior em condições termofílicas. Além disso, foi reportada uma maior velocidade de crescimento dos microrganismos termofílicos se comparados aos mesofílicos e, uma menor solubilidade do hidrogênio na fase aquosa em altas temperaturas, o que reduz seu consumo por outros microrganismos (SANTOS, 2014; FARIA, 2014 & FUESS, 2017).

Na Tabela 13 encontra-se a concentração de açúcares no meio fermentativo no início e após 24 h de fermentação conduzida em condições termofílicas.

Tabela 13. Concentração e percentual de consumo de açúcares no meio fermentativo no início e após 24h de fermentação termofílica, utilizando MS 1 como fonte de carbono e com concentração inicial de açúcares de aproximadamente 3,0 gL⁻¹.

	<i>Concentração (mmol.L⁻¹)</i>		<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>		<i>% consumo</i>
	0 h	24 h	0 h	24 h	
<i>Manose</i>	12,89 ± 0,49	0,20 ± 0,03	2,32 ± 0,09	0,04 ± 0,01	98,45
<i>Xilose</i>	1,08 ± 0,08	1,13 ± 0,16	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,00
<i>Galactose</i>	0,96 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,02	0,00 ± 0,00	100
<i>Glicose</i>	0,83 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,00	93,80
<i>Arabinose</i>	0,77 ± 0,03	0,67 ± 0,05	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	13,12

A produção de ácidos acético e butírico após 24 h de fermentação mesofílica foi de 17,67 mM e 7,27 mM, respectivamente. Na fermentação termofílica houve uma produção de ácidos mais reduzida, atingindo as concentrações de 8,87 mM para o ácido acético e 1,30 mM para o ácido butírico, em 24 h.

Comparando os resultados já apresentados das fermentações mesofílicas, notou-se um maior rendimento no ensaio apresentado nesta seção. Isso pode ser atribuído a menor concentração inicial de açúcares, que pode resultar em uma metabolização mais rápida, já que há menor quantidade de açúcares disponíveis no meio, aumentando o rendimento da produção de hidrogênio. Além disso, a possibilidade de inibição dos microrganismos por alta concentração das fontes de carbono é reduzida nestas condições.

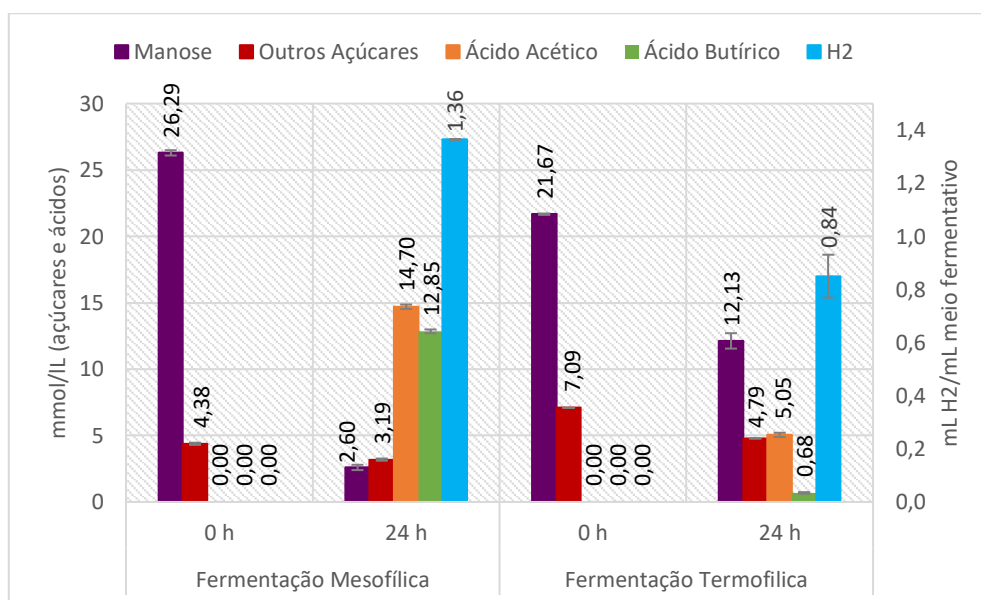
Para se obter um retrato mais realista da fermentação com HSA, também foram testadas fermentações mesofílicas e termofílicas com maiores concentrações iniciais de açúcares, se assemelhando mais ao ensaio com HSA como fonte de carbono.

- **Concentração inicial de açúcares no meio fermentativo de aproximadamente 5gL^{-1}**

As fermentações mesofílicas foram conduzidas utilizando meio sintético MS 3 como fonte de carbono e o lodo L3 como fonte de microrganismos. Já na fermentação termofílica foi utilizado o meio sintético MS 1 e lodo anaeróbico L1. Os meios sintéticos MS 1 e MS 3 foram diluídos para atingir a concentração inicial de aproximadamente 5gL^{-1} no meio fermentativo.

O Gráfico 25 representa a concentração de açúcares, ácidos acético e butírico e hidrogênio do meio fermentativo no início do ensaio e após 24h de fermentação mesofílica e termofílica.

Gráfico 25. Quantificação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido butírico e hidrogênio no início e após 24 h de fermentação mesofílica e termofílica com concentração inicial de açúcares de aproximadamente $5,0\text{gL}^{-1}$.



O volume específico de hidrogênio produzido relativo à condição mesofílica se mostrou superior ao da condição mesofílica, atingindo $1,36\text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{mL}_{\text{meio fermentativo}}$ enquanto em condição termofílica foi atingido $0,84\text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{mL}_{\text{meio fermentativo}}$. Foi apresentado um resultado bastante inferior de produção se comparado a fermentação mesofílica e aos resultados apresentados com concentração inicial de açúcares de 3gL^{-1} , que foram equivalentes. Desta forma, é necessária uma maior investigação para verificar se a condição mesofílica apresenta uma possível vantagem em relação à produção.

A fermentação mesofílica apresentou um rendimento de $1,82\text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}}$ em 24 h de inoculação. O resultado condiz com o resultado mencionado na seção 6.3.1

deste capítulo ($1,79 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}}$), que foi conduzido em condições similares. A fermentação termofílica apresentou rendimento reduzido em relação a fermentação mesofílica, atingindo apenas $1,16 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}}$ em 24 h.

Ambos os casos apresentaram redução na produção se comparados aos ensaios cujos meios fermentativos apresentavam concentrações iniciais de açúcar de 3 gL^{-1} . No caso da fermentação mesofílica, o rendimento passou de $2,94 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}}$, com concentração inicial de 3 gL^{-1} , para $1,82 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}}$, com concentração inicial de 5 gL^{-1} . Da mesma forma, o rendimento de hidrogênio das fermentações termofílicas passou de $3,24 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}}$ para $1,16 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}}$, respectivamente. A queda no desempenho da produção pode ser atribuída à maior presença de açúcares, já que é necessário um tempo de fermentação maior para que os microrganismos possam metabolizar uma quantidade maior de açúcares. Além disso pode ocorrer inibição do metabolismo dos microrganismos pelo excesso de fonte de carbono, reduzindo o rendimento da fermentação.

Em condições mesofílicas, 90% da manose foi consumida em 24 h. Os demais açúcares, não apresentaram grande consumo individualmente, no geral foram consumidos cerca de 18% destes açúcares, apresentando baixos percentuais de consumo.

A Tabela 14 apresenta os dados de concentração molar e percentual de consumo de todos os açúcares contidos no meio fermentativo, no ponto inicial e após 24 h de fermentação mesofílica.

Tabela 14. Concentração de açúcares e percentual de consumo no meio fermentativo no início e após 24 h de fermentação mesofílica utilizando meio sintético MS 3 como fonte de carbono e com concentração inicial de açúcares de aproximadamente $5,0 \text{ gL}^{-1}$.

	<i>Concentração (mmol.L⁻¹)</i>		<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>		<i>% consumo</i>
	0 h	24 h	0 h	24 h	
<i>Manose</i>	26,29	$2,60 \pm 0,20$	4,74	$0,48 \pm 0,04$	90,11
<i>Xilose</i>	2,45	$1,92 \pm 0,06$	0,37	$0,29 \pm 0,01$	21,63
<i>Glicose</i>	0,37	$0,38 \pm 0,01$	0,07	$0,07 \pm 0,00$	0,00
<i>Arabinose</i>	1,08	$0,88 \pm 0,01$	0,23	$0,13 \pm 0,00$	18,52
<i>Galactose</i>	0,00	$0,00 \pm 0,00$	0,00	$0,00 \pm 0,00$	-

A galactose não foi detectada pelo instrumento nem no início e nem ao fim da fermentação. É possível que sua concentração estivesse abaixo do limite de detecção do equipamento de CLAE, o que impossibilitou sua quantificação no momento da análise.

Na fermentação termofílica, aproximadamente 44% da manose contida no meio inicialmente foi consumida em 24 h, um percentual baixo, considerando os resultados dos ensaios apresentados anteriormente. Apenas 32% dos outros açúcares foram consumidos neste mesmo intervalo. A Tabela 15 apresenta o consumo de açúcares durante ao fim da fermentação e seu respectivo percentual de consumo.

Tabela 15. Concentração e percentual de consumo dos açúcares presentes no meio fermentativo no início e após 24h de fermentação termofílica utilizando meio sintético MS 1 como fonte de carbono e com concentração inicial de açúcares de aproximadamente 5,0 gL⁻¹.

	<i>Concentração (mmol.L⁻¹)</i>		<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>		<i>% consumo</i>
	0 h	24 h	0 h	24 h	
<i>Manose</i>	21,67 ± 0,05	12,13 ± 0,58	3,90 ± 0,01	2,19 ± 0,10	44,02
<i>Xilose</i>	2,42 ± 0,00	1,51 ± 0,02	0,36 ± 0,00	0,23 ± 0,00	37,60
<i>Glicose</i>	1,37 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,25 ± 0,00	0,02 ± 0,00	90,51
<i>Arabinose</i>	1,35 ± 0,03	1,42 ± 0,10	0,20 ± 0,00	0,21 ± 0,02	0,00
<i>Galactose</i>	1,95 ± 0,00	1,72 ± 0,02	0,35 ± 0,00	0,31 ± 0,00	11,79

Em relação aos ácidos, em 24 h de fermentação mesofílica, a concentração atingida foi de 14,7 mM de ácido acético e 12,85 mM de ácido butírico. Assim, conforme relatado nos ensaios com concentração inicial de açúcares de 3,0 gL⁻¹, a fermentação termofílica produziu menores quantidades de ácidos no mesmo tempo de inoculação, sendo 5,05 mM de ácido acético e 0,68 mM de ácido butírico.

Estes resultados corroboram a influência da concentração inicial de açúcares no rendimento e na produção de hidrogênio. Nos casos em que a concentração inicial de açúcares foi maior, se aproximando da concentração inicial do meio com HSA, a fermentação mesofílica apresentou resultados mais vantajosos.

Uma das possíveis justificativas para a redução do rendimento e do consumo de açúcares é a maior disponibilidade de fonte de carbono no meio, levando mais tempo para que os microrganismos possam metabolizar os açúcares, e exigindo mais tempo para que se possa atingir os mesmos rendimentos. Além disso, pode haver inibição da atividade dos microrganismos pelo excesso de fonte de carbono. A alta concentração inicial de açúcares no meio pode evitar a re-esporulação de microrganismos produtores de hidrogênio. Outro ponto que pode ser considerado é a inibição pela alta concentração de

co-produtos no meio, como ácidos orgânicos. Os ácidos acético e butírico podem interferir no metabolismo da célula, reduzindo a produção de hidrogênio.

6.3.3 Acompanhamento do perfil cinético de fermentação para a produção de hidrogênio com meio sintético como fonte de carbono

Foram realizados ensaios de estudo do perfil cinético do consumo de açúcares e da produção de hidrogênio e coprodutos da fermentação em condições mesofílicas e termofílicas para verificar o padrão de consumo dos microrganismos.

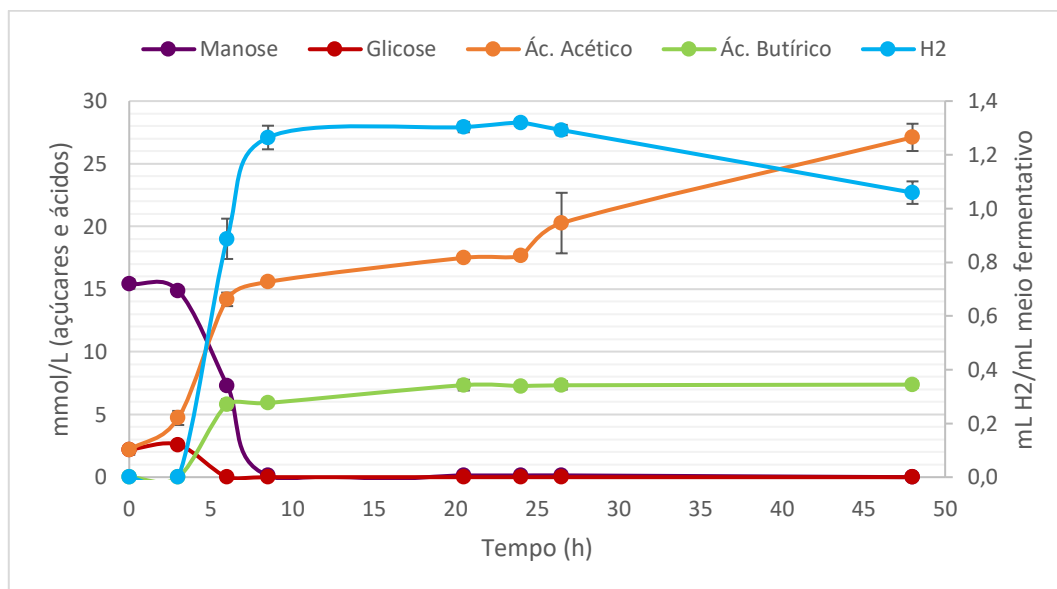
- **Perfil cinético da fermentação mesofílica com meio sintético**

A glicose é o açúcar preferencialmente consumido pelos microrganismos anaeróbios. No entanto, a manose é o açúcar que está presente no HSA de forma majoritária, sendo sua concentração muito superior à concentração de glicose. Desta forma, é interessante investigar e comparar a capacidade de metabolização destes açúcares por parte dos microrganismos presentes no inóculo.

O acompanhamento foi realizado utilizando somente glicose e manose como componentes do meio sintético que foi utilizado como fonte de carbono. A composição do meio fermentativo no início da incubação foi de $2,78 \text{ gL}^{-1}$ ($15,42 \text{ mM}$) de manose e $0,40 \text{ gL}^{-1}$ ($2,2 \text{ mM}$) de glicose. O meio sintético MS 2 foi utilizado como fonte de carbono e o lodo L2 foi utilizado como inóculo neste ensaio.

No Gráfico 26, se encontram as concentrações de açúcares, ácidos acético e butírico e hidrogênio no meio fermentativo nos tempos de 0 h, 3 h, 6 h, 8,5 h, 20,5 h, 24 h, 26,5 h e 48 h de fermentação.

Gráfico 26. Acompanhamento do consumo de açúcares e produção de hidrogênio e ácidos acético e butírico durante a fermentação mesofílica com meio sintético MS 2, composto por manose e glicose, como fonte de carbono.



Nas primeiras 3 h de fermentação, 3% da manose presente no meio fermentativo foi consumida e 49% deste açúcar foi consumido nas 3 h seguintes. Em 8,5 h de fermentação, 99% da manose já havia sido consumida. A glicose do meio foi totalmente consumida em apenas 6 h de inoculação. O consumo de grande parte dos açúcares presentes no meio, em poucas horas, pode ser atribuído à concentração diluída dos açúcares, o que facilita o acesso e a metabolização por parte dos microrganismos.

A produção de hidrogênio teve início a partir das 3 h de fermentação, se estabilizando em 8,5 h e apresentando volume específico máximo em 24 h em 1,32 mL_{H2}/mL_{meiofermentativo}. Em 48 h, a produção atingiu 1,06 mL_{H2}/mL_{meiofermentativo}, indicando início de consumo do hidrogênio produzido no meio. Este consumo aliado ao aumento da concentração de ácido acético no meio pode indicar a ocorrência da etapa de Acidogênese da digestão anaeróbia, ocorrendo o consumo de hidrogênio e a produção de ácido acético provocado pela atividade das bactérias homoacetogênicas.

Leitão (2018), em condições similares, com concentração inicial de manose de aproximadamente 4,5 gL⁻¹ e razão DQO_{substato}/SSV_{inóculo} de 0,5, reportou início da produção de hidrogênio em 6 h de inoculação, se estabilizando a partir de 26 h e se estendendo até 28 h. Estes resultados indicam que em meios com concentração inicial de açúcares mais baixa, o consumo de açúcares se inicia mais rapidamente, começando a produção de hidrogênio mais cedo, e conseqüentemente, aumentando o rendimento da fermentação.

Foram produzidos 15,57 mM de ácido acético e 5,92 mM de ácido butírico em 8,5 h de fermentação. A partir de 20,5 h de fermentação, a produção de ácido acético havia se estabilizado, chegando a 7,38 mM em 48 h. Já a produção de ácido acético se manteve em crescimento, atingindo 27,11 mM no mesmo intervalo.

Na Tabela 16, encontra-se a composição de açúcares e ácidos no meio fermentativo durante as 48 h de fermentação.

Tabela 16. Acompanhamento da concentração de açúcares e ácidos durante a fermentação mesofílica com meio sintético MS 2.

<i>tempo (h)</i>	<i>Concentração, mmol.L⁻¹</i> <i>(g.L⁻¹)</i>				<i>Produtividade</i> <i>(mol_{H2}/mol_{carboidrato}.h)</i>
	Manose	Glicose	Ác. Acético	Ác. Butírico	H₂
0	15,42 ± 0,38 (2,78 ± 0,07)	2,20 ± 0,25 (0,40 ± 0,04)	2,18 ± 0,39 (0,13 ± 0,02)	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	0,00
3	14,87 ± 0,28 (2,68 ± 0,05)	2,59 ± 0,09 (0,47 ± 0,02)	4,72 ± 0,56 (0,28 ± 0,03)	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	0,00 ± 0,00
6	7,32 ± 0,28 (1,32 ± 0,05)	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	14,18 ± 0,54 (0,85 ± 0,03)	5,79 ± 0,43 (0,51 ± 0,04)	0,33 ± 0,03
8,5	0,14 ± 0,00 (0,02 ± 0,00)	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	15,57 ± 0,00 (0,94 ± 0,00)	5,92 ± 0,00 (0,52 ± 0,00)	0,33 ± 0,01
20,5	0,14 ± 0,01 (0,02 ± 0,00)	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	17,50 ± 0,12 (1,05 ± 0,01)	7,34 ± 0,43 (0,65 ± 0,04)	0,14 ± 0,00
24	0,14 ± 0,00 (0,02 ± 0,00)	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	17,67 ± 0,04 (1,06 ± 0,00)	7,27 ± 0,14 (0,64 ± 0,01)	0,12 ± 0,00
26,5	0,14 ± 0,00 (0,03 ± 0,00)	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	20,27 ± 2,42 (1,22 ± 0,15)	7,33 ± 0,34 (0,65 ± 0,03)	0,11 ± 0,00
48	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	0,00 ± 0,00 (0,00 ± 0,00)	27,11 ± 1,09 (1,63 ± 0,07)	7,38 ± 0,27 (0,65 ± 0,02)	0,05 ± 0,00

A produtividade máxima foi atingida entre 6 h e 8,5 h de inoculação, atingido 0,33 mol_{H2}/mol_{carboidrato}.h. Esta produtividade considerada alta em pouco tempo de inoculação pode ser atribuída à baixa concentração inicial de açúcares presente no meio, que facilita a metabolização dos açúcares em pouco tempo e permite o seu total consumo em pouco tempo.

Ambos os açúcares foram metabolizados pelos microrganismos, gerando hidrogênio. Mesmo em concentração menor, a glicose do meio foi completamente consumida, enquanto a manose ainda se apresentava altas concentrações no meio.

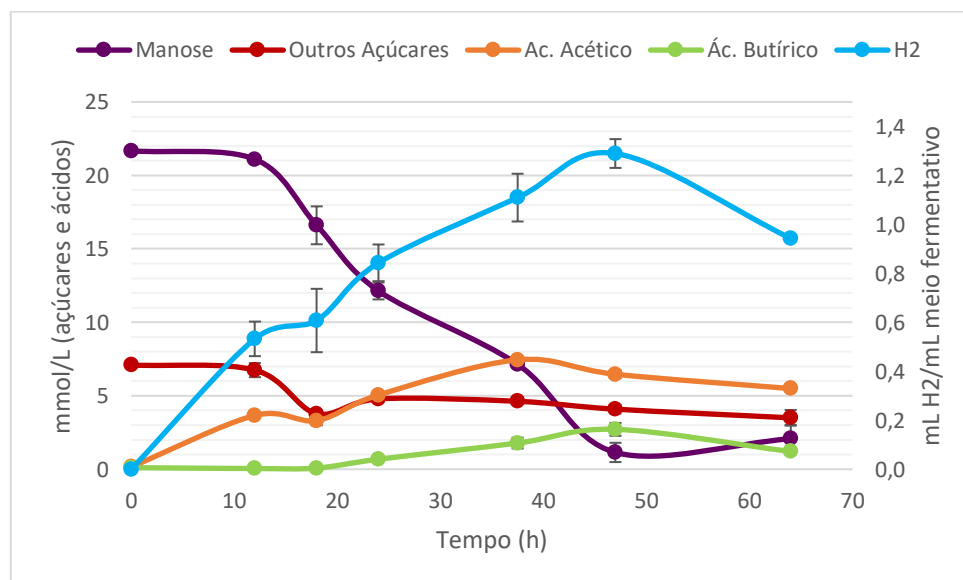
- **Perfil cinético da fermentação termofílica com meio sintético**

A avaliação do perfil de consumo dos açúcares e de produção de hidrogênio e co-produtos pelos microrganismos anaeróbios durante a fermentação termofílica, é de grande interesse. Assim, foi realizado um acompanhamento da concentração destes componentes durante o tempo de inoculação.

A fermentação termofílica foi realizada com meio sintético buscando uma concentração de açúcares inicial de aproximadamente $5,0 \text{ gL}^{-1}$ ($28,8 \text{ mM}$). Neste ensaio foi utilizado o lodo L1 como inóculo e o meio sintético MS 1 como fonte de carbono.

No Gráfico 27, encontra-se a concentração de açúcares, ácidos acético e butírico e hidrogênio no meio fermentativo durante a fermentação termofílica. As amostras foram colhidas em 0 h, 12 h, 18 h, 24 h, 37,5 h, 47 h e 67 h de inoculação.

Gráfico 27. Acompanhamento do consumo de açúcares e produção de hidrogênio e ácidos acético e butírico durante a fermentação termofílica com meio sintético MS 1 como fonte de carbono.



A fermentação teve sua produção de hidrogênio máxima em 47 h de inoculação com $1,29 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{mL}_{\text{meio fermentativo}}$. Neste intervalo, cerca de 95% da manose e 42% dos outros açúcares contidos no meio inicialmente haviam sido consumidos. A produção de ácido butírico também teve seu máximo no mesmo intervalo, chegando a $2,71 \text{ mM}$. Por

outro lado, a produção de ácido acético apresentou seu valor mais elevado em 37,5 h, com 7,45 mM. Nota-se que a produção de ácidos nas condições termofílicas é reduzida se comparada aos ensaios mesofílicos, indicando a possível adoção de uma rota metabólica alternativa.

A partir de 47 h de inoculação nota-se o consumo do hidrogênio produzido no meio, que aliado ao consumo de ácido acético, pode indicar a ocorrência da etapa de Metanogênese da digestão anaeróbia com atuação das arqueas metanogênicas. Para confirmar esta informação é necessário acompanhar a produção de metano no meio e verificar se ocorreu produção deste gás.

Na Tabela 17 encontram-se descritas as composições dos açúcares e ácidos e do rendimento de hidrogênio durante o acompanhamento da fermentação termofílica.

Tabela 17. Acompanhamento da concentração de açúcares e ácidos durante a fermentação termofílica com meio sintético MS 1.

<i>tempo (h)</i>	<i>Concentração, mmol.L⁻¹</i> <i>(g.L⁻¹)</i>				<i>Produtividade</i> <i>(mol_{H2}/mol_{carboidrato}.h)</i>
	Manose	Outros açúcares	Ác. Acético	Ác. Butírico	H₂
0	21,67 ± 0,05 (3,90 ± 0,01)	7,09 ± 0,00 (1,16 ± 0,00)	0,17 ± 0,03 (0,01 ± 0,00)	0,11 ± 0,01 (0,01 ± 0,00)	0,00
12	21,10 ± 0,16 (3,80 ± 0,03)	6,74 ± 0,48 (1,06 ± 0,07)	3,66 ± 0,12 (0,22 ± 0,01)	0,05 ± 0,01 (0,00 ± 0,00)	0,06 ± 0,01
18	16,60 ± 1,29 (2,99 ± 0,23)	3,78 ± 0,19 (0,55 ± 0,03)	3,31 ± 0,31 (0,20 ± 0,02)	0,08 ± 0,02 (0,01 ± 0,00)	0,05 ± 0,00
24	12,13 ± 0,58 (2,19 ± 0,10)	4,79 ± 0,12 (0,80 ± 0,02)	5,05 ± 0,16 (0,30 ± 0,01)	0,68 ± 0,06 (0,06 ± 0,01)	0,04 ± 0,00
37,5	7,14 ± 0,26 (1,29 ± 0,05)	4,62 ± 0,09 (0,76 ± 0,01)	7,45 ± 0,02 (0,45 ± 0,00)	1,78 ± 0,37 (0,16 ± 0,03)	0,03 ± 0,00
47	1,14 ± 0,66 (0,21 ± 0,12)	4,09 ± 0,30 (0,65 ± 0,04)	6,46 ± 0,27 (0,39 ± 0,02)	2,71 ± 0,44 (0,24 ± 0,04)	0,04 ± 0,00
64	2,08 ± 0,94 (0,37 ± 0,17)	3,50 ± 0,53 (0,47 ± 0,08)	5,49 ± 0,13 (0,33 ± 0,01)	1,21 ± 0,06 (0,11 ± 0,01)	0,02 ± 0,00

Neste ensaio, o tempo necessário para atingir a produtividade máxima de $0,06 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}} \cdot \text{h}$, foi de 12 h, porém foi verificado que a produção foi bastante reduzida, e foram necessárias 47 h para atingir a produção máxima. Considerando esses ensaios, há um indicativo de desvantagem da fermentação termofílica nas condições experimentais estudadas. No entanto, são necessários experimentos confirmatórios e avaliação em outras condições experimentais, a fim de melhor comparar a produção de H_2 em condições mesofílicas ou termofílicas.

6.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO POR FERMENTAÇÃO MESOFÍLICA UTILIZANDO HSA COMO FONTE DE CARBONO

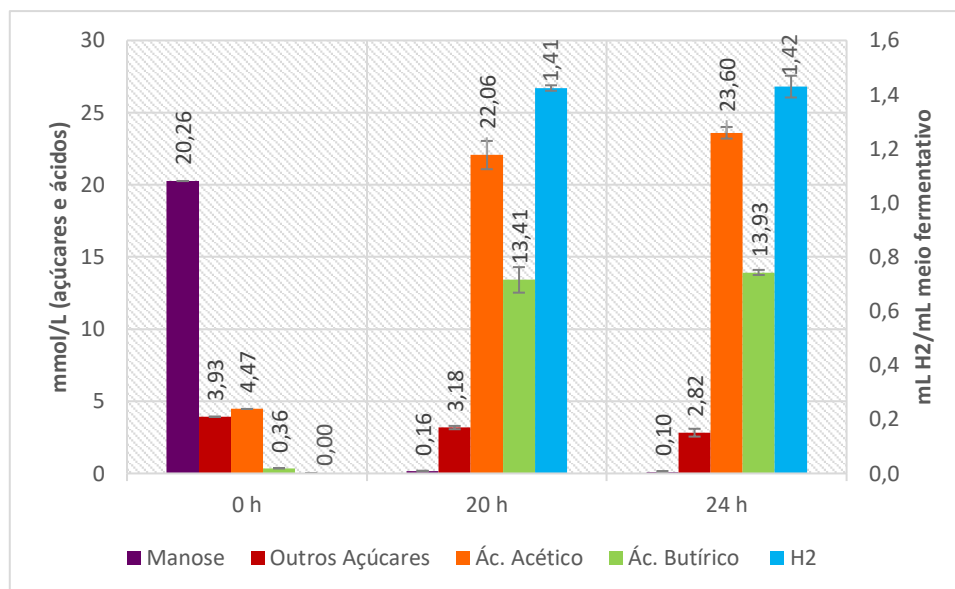
Para este caso, foi adotada a condição que gerou melhor desempenho em relação ao volume específico de produção de hidrogênio: a fermentação realizada sob condição mesofílica em concentração inicial de açúcares de 5 gL^{-1} , que atingiu $1,36 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{mL}_{\text{meiofermentativo}}$ em 24 h. Além disso, esta condição se torna mais vantajosa por apresentar condições mais brandas.

Leitão (2018) realizou um estudo em condições similares comparando diferentes proporções e concentrações da razão $\text{DQO}_{\text{substrato}}/\text{SSV}_{\text{inóculo}}$, e concluiu que a condição mais atrativa foi a de razão 0,25, com concentrações de $5,33 \text{ gL}^{-1}/21,33 \text{ gL}^{-1}$. Desta forma, esta condição foi adotada para este estudo.

As fermentações foram conduzidas utilizando HSA 1 como fonte de carbono, com pré-tratamento térmico e em condições mesofílicas. O HSA 1 foi diluído para um valor de $\text{DQO}_{\text{substrato}}$ de $5,33 \text{ gL}^{-1}$ no meio fermentativo. O objetivo era verificar e comparar o desempenho da fermentação utilizando HSA, aos resultados já apresentados com meio sintético. O lodo anaeróbio L3 foi utilizado como inóculo.

O Gráfico 28 representa a concentração de açúcares, ácidos acético e butírico e hidrogênio no meio fermentativo nos tempos de 0 h, 20 h e 24 h de fermentação. A concentração inicial de açúcares foi de $4,3 \text{ gL}^{-1}$ ($24,19 \text{ mM}$).

Gráfico 28. Quantificação da concentração de açúcares, ácido acético, ácido butírico e hidrogênio no início e após 20 h e 24 h de fermentação mesofílica com HSA 1 como fonte de carbono.



A produção de hidrogênio atingiu 1,41 mL_{H₂}/mL_{meiofermentativo} em 20 h e 1,42 mL_{H₂}/mL_{meiofermentativo} em 24 h, resultado superior aos apresentados na seção 3.6.2 em condição mesofílica e com meio sintético (1,36 mL_{H₂}/mL_{meiofermentativo} para concentração inicial de açúcares de 5gL⁻¹). Este resultado indica uma possível vantagens da utilização do HSA em relação ao meio sintético.

A fermentação utilizando HSA apresentou um rendimento de 2,39 mol_{H₂}/mol_{carboidrato} em 20 h de inoculação, chegando a 2,41 mol_{H₂}/mol_{carboidrato}, em 24 h. Aproximadamente 99% da manose e cerca de 28% dos demais açúcares foram consumidos no meio fermentativo em 24 h. Em ensaios realizados anteriormente em nosso grupo de estudos, Leitão (2018) obteve 2,23 mol_{H₂}/mol_{carboidrato} de rendimento e 79,5% da manose consumida em 24 h de inoculação em condições similares. Em ensaios com glicose como meio sintético, foram atingidos rendimentos entre 1,78 mol_{H₂}/mol_{carboidrato} à 2,19 mol_{H₂}/mol_{carboidrato} (DE SÁ, *et al.*, 2013), indicando que o resultado atingido com HSA como fonte de carbono foi bastante expressivo e vantajoso.

Os resultados apresentados pelos ensaios de fermentação mesofílica com HSA foram mais atrativos se comparados aos resultados com meio sintético. Na seção 6.3.2 foi apresentado um ensaio com meio sintético e com concentração inicial de açúcares próxima à 5,0 gL⁻¹, para o qual foi obtido um rendimento de 1,82 mol_{H₂}/mol_{carboidrato} em 24 h. Nota-se que o rendimento da fermentação mesofílica com HSA superou em aproximadamente 30% o rendimento apresentado pelo ensaio com meio sintético. Do

mesmo modo, o consumo de açúcares ocorreu de forma mais eficiente quando o HSA foi adotado como fonte de carbono. A Tabela 18 apresenta os dados de consumo de açúcares e sua respectiva concentração no meio fermentativo em 0 h, 20 h e 24 h de fermentação.

Tabela 18. Concentração e percentual de consumo de açúcares no meio fermentativo no início e após 20h e 24h de fermentação utilizando HSA 1 como fonte de carbono.

	<i>Concentração (mmol.L⁻¹)</i>			<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>			<i>% consumo</i>
	0 h	20 h	24 h	0 h	20 h	24 h	
<i>Manose</i>	20,26	0,16 ± 0,06	0,10 ± 0,03	3,65	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	99,51
<i>Xilose</i>	1,80	1,60 ± 0,07	1,50 ± 0,07	0,27	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,01	16,67
<i>Galactose</i>	1,01	0,74 ± 0,06	0,62 ± 0,11	0,18	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,02	38,61
<i>Arabinose</i>	0,66	0,47 ± 0,05	0,36 ± 0,09	0,10	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	45,45
<i>Glicose</i>	0,46	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,08	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00	23,91

A produção de ácido butírico foi similar ao caso em que houve a utilização de meio sintético, atingindo 13,93 mM em 24 h. Por outro lado, a produção de ácido acético se mostrou superior, chegando a 23,6 mM no mesmo intervalo.

Foi possível assegurar a produção de hidrogênio a partir do HSA, que foi utilizado como fonte de carbono para a fermentação, apresentando rendimento e produção específica satisfatórios e superiores aos resultados performados durante os ensaios com meio sintético.

Monteiro e colaboradores (2019) mostraram que nas condições de hidrólise adotadas, a produção de substâncias tóxicas, como hidroximetilfurfural (HMF), furfural e ácido acético, foi reduzida o suficiente para não causar interferências na produção de hidrogênio. Considerando isso, o maior rendimento de hidrogênio apresentado no ensaio que utilizou HSA como fonte de carbono pode ser atribuído ao fato deste meio ser mais rico se comparado ao meio sintético. O meio sintético tem uma composição bem definida, sendo composto apenas pelos principais açúcares presentes no HSA. Na etapa de hidrólise da semente de açaí moída, além dos açúcares, outras substâncias podem ser recuperadas no HSA, como por exemplo fenóis, proteínas e outros carboidratos. Esta variedade de substâncias pode atuar positivamente favorecendo o metabolismo dos microrganismos e contribuindo para a produção de hidrogênio e coprodutos envolvidos.

6.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO AUMENTO DE ESCALA NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO HSA

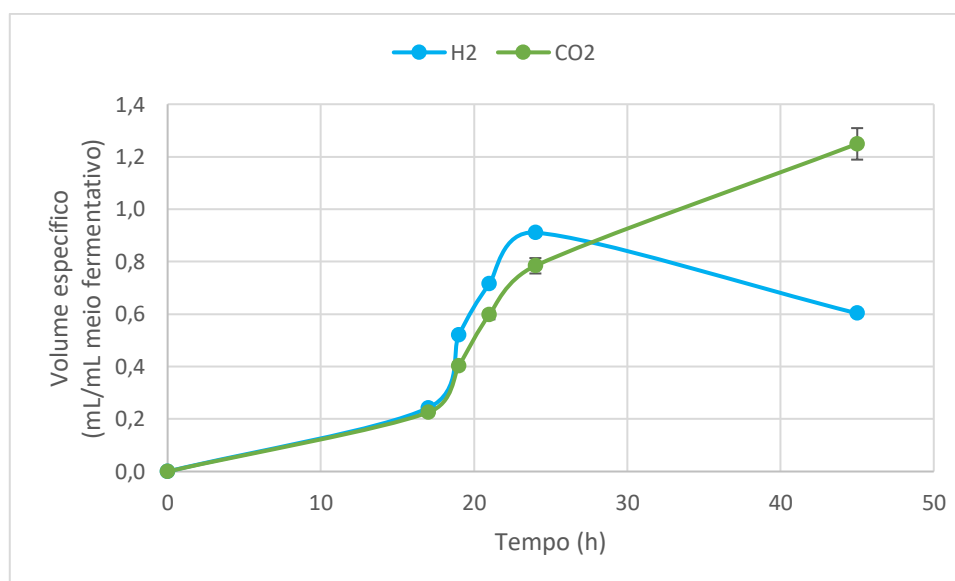
Este ensaio foi realizado como estudo preliminar sobre o aumento de escala da produção biológica de hidrogênio através do hidrolisado da semente de açaí. Neste ensaio foi utilizado o lodo anaeróbico L4 e o HSA 3, que apresenta composição destoante dos demais.

Neste caso especificamente, não houve quantificação de amostragem líquida do meio fermentativo pela técnica de CLAE. O rendimento e a produtividade foram calculados considerando a diluição dos açúcares do HSA 3, cuja composição foi determinada pela técnica de CLAE. A concentração inicial total de açúcares no meio fermentativo foi de 2,42 g/L (14 mM), sendo 1,88 g/L (10,42 mM) de manose.

A produção de hidrogênio e de dióxido de carbono foi medida nos seguintes tempos de fermentação: 17 h, 19 h, 21 h, 24 h e 45 h. Nos demais ensaios de fermentação, a produção de CO₂ não foi medida.

O ensaio foi realizado em duplicata, e ao fim foi verificado vazamento em um dos sistemas. Ainda assim, os resultados apresentados até o ponto de 24 h foram consistentes em comparação com o outro sistema. O Gráfico 29 representa a produção de hidrogênio e gás carbônico durante a fermentação nos tempos 0 h, 17 h, 19 h, 21 h, 24 h e 45 h.

Gráfico 29. Acompanhamento do rendimento e produtividade da produção de hidrogênio e dióxido de carbono com HSA 3 como fonte de carbono no ensaio de aumento de escala da fermentação mesofílica.



Analisando a Tabela 19, é possível notar que a produtividade máxima de hidrogênio foi atingida em 24 h de fermentação com $0,11 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}\cdot\text{h}}$. A partir deste ponto, a produtividade decai chegando a $0,04 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}\cdot\text{h}}$ em 45 h. Da mesma forma, a produtividade de CO_2 se mantém em crescimento até 24 h, quando atinge seu máximo $0,08 \text{ mol}_{\text{CO}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}\cdot\text{h}}$.

Tabela 19. Rendimento e produtividade da produção de hidrogênio e dióxido de carbono com HSA 3 como fonte de carbono no ensaio de aumento de escala da fermentação mesofílica nos tempos 0 h, 17 h, 19 h, 21 h, 24 h e 45 h.

<i>tempo</i> (h)	<i>Volume específico (mL/mL)</i>		<i>Produtividade (mol/mol_{carboidrato}·h)</i>	
	H₂	CO₂	H₂	CO₂
0	0,00	0,00	0,00	0,00
17	$0,24 \pm 0,00$	$0,22 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$
19	$0,52 \pm 0,00$	$0,40 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$
21	$0,71 \pm 0,00$	$0,60 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$
24	$0,91 \pm 0,00$	$0,78 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$
45	$0,60 \pm 0,00$	$1,25 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$

Os resultados apresentados no ensaio de aumento de escala se aproximam não só dos resultados da fermentação com HSA em pequena escala, mas também dos resultados do ensaio com meio sintético e concentração inicial de açúcares de $3,0 \text{ gL}^{-1}$. Porém, é importante ressaltar que este foi um ensaio preliminar e, devem ser realizados estudos mais aprofundados para validar os resultados obtidos. Apesar do HSA 3 apresentar composição divergente dos demais hidrolisados, a proporção dos açúcares é similar, e as concentrações iniciais de açúcar no meio fermentativo se aproximam do ensaio com 3 gL^{-1} de açúcar. Considerando isso, nota-se que houve uma redução na produção rendimento, de $1,32 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}}$, no ensaio com concentração de açúcares de aproximadamente 3 gL^{-1} e meio sintético, para $0,91 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{carboidrato}\cdot\text{h}}$, no ensaio de aumento de escala com HSA e concentração inicial de açúcares de $2,42 \text{ gL}^{-1}$. Isso indica que devem ser realizados mais estudos com aumento de escala para otimizar a produção.

Pode-se afirmar que apesar dos problemas de vazamento que ocorreram em um dos sistemas, houve reprodutibilidade dos resultados entre as duplicatas no aumento de escala do processo fermentativo.

6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do mapeamento tecnológico realizado, pode-se constatar o interesse crescente pela produção biológica de hidrogênio nos últimos anos. Já existem algumas tecnologias em nível avançado de desenvolvimento, mas a grande maioria das tecnologias ainda se encontram na fase inicial de desenvolvimento, submetidas a estudos científicos, o que indica que majoritariamente as tecnologias estarão disponíveis a logo prazo.

Conforme exposto na Tabela 20, considerando os ensaios com meio sintético como fonte de carbono, quase todos os ensaios apresentaram a mesma produção em volume específico, aproximadamente $1,35 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{mL}_{\text{meiofermentativo}}$, com exceção do ensaio onde foi utilizado o inóculo *in natura* e o ensaio em condição termofílica com 5gL^{-1} de concentração inicial de açúcares. O primeiro se justifica, já que com o inóculo pré-tratado é possível realizar uma fermentação mais seletiva. A fermentação termofílica com 5gL^{-1} de concentração inicial de açúcares deve ser melhor investigada para confirmar os resultados.

Nos ensaios onde foi utilizado HSA como fonte de carbono, obteve-se resultado de volume específico superior ao caso com meio sintético em pequena escala. No ensaio de *scale-up* obteve-se resultado inferior, mostrando que devem ser realizados mais estudos para otimização deste processo

De forma geral, foi possível utilizar a semente de açaí como a fonte de carboidratos a ser metabolizada por culturas mistas de microrganismos para a produção de hidrogênio em pequena escala e no aumento de escala. Foram apresentados resultados satisfatórios de consumo de açúcares e rendimento da produção de hidrogênio em pequena escala, o que indica a semente de açaí como uma potencial matéria-prima para a produção descentralizada de energia.

Tabela 20: Resumo dos resultados obtidos através dos ensaios experimentais.

	<i>Meio Sintético como fonte de carbono</i>						<i>HSA como fonte de carbono</i>	
	<i>Inóculo in natura</i>	<i>Inóculo pré-tratado</i>	<i>Concentração inicial de açúcares de 3gL⁻¹</i>		<i>Concentração inicial de açúcares de 5gL⁻¹</i>		<i>Pequena escala</i>	<i>Scale-up (em 24h)</i>
	<i>Condição mesofílica</i>		<i>Condição mesofílica</i>	<i>Condição termofílica</i>	<i>Condição mesofílica</i>	<i>Condição termofílica</i>	<i>Condição mesofílica</i>	
<i>Vol. Específico de H₂ (mL/mL)</i>	0,96	1,32	1,32	1,35	1,36	0,84	1,42	0,91
<i>% consumo açúcares</i>	100	100	99	86	81	41	88	-

7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

7.1 CONCLUSÕES

De acordo com as análises e estudos realizados, foi possível obter as seguintes conclusões:

- O mapeamento tecnológico indica uma forte tendência no desenvolvimento do processo produtivo de hidrogênio. Enquanto as pesquisas científicas direcionam os estudos principalmente para a otimização dos processos, as empresas focam na biotecnologia;
- Pode-se assegurar a produção de hidrogênio utilizando manose como principal açúcar a ser fermentado, já que apresentou resultados satisfatórios de percentual de consumo e de rendimento;
- Os resultados indicaram a superioridade de produção de hidrogênio quando foi realizado o pré-tratamento térmico do inóculo;
- Tanto para condições mesofílicas como para termofílicas, a produção apresentou maior eficiência nos ensaios que continham concentrações iniciais de açúcares próximas a 3,0 gL⁻¹;
- Para concentrações iniciais de açúcares próximas à 5,0 gL⁻¹, as condições mesofílicas se mostraram mais vantajosas e, por isso, essa metodologia foi seguida para os ensaios seguintes com o HSA;
- Para os ensaios onde não houve variação do método, foi possível verificar a reprodutibilidade da concentração e da proporção dos açúcares obtidos no HSA;
- Foi comprovada a produção de hidrogênio com HSA, apresentando rendimento superior ao ensaio com meio sintético.
- Com a extrapolação da escala da produção mesofílica de hidrogênio de 45 mL para 450 mL com HSA como substrato houve redução da produção específica.

7.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Algumas sugestões de assuntos a serem explorados mais detalhadamente em trabalhos futuros são:

- Utilizar outras bases de depósito de patentes para a busca do mapeamento tecnológico, como a Patent Scope;

- Melhorar a eficiência do pré-tratamento térmico do inóculo para redução do consumo de hidrogênio avaliando a temperatura e o tempo de tratamento;
- Avaliar a produção de hidrogênio via fermentação termofílica em temperaturas mais amenas (40-50 °C) utilizando HSA como fonte de carbono;
- Repetir e otimizar a produção de hidrogênio via fermentação mesofílica com HSA em maior escala avaliando a agitação do meio;
- Avaliar a produção de hidrogênio via fermentação termofílica em maior escala utilizando HSA como fonte de carbono;
- Avaliar o perfil cinético de produção de hidrogênio e consumo de açúcares da fermentação em condições termofílicas com concentração inicial de açúcares de 3gL^{-1} .
- Verificar se ocorre a produção de metano ou de outros coprodutos durante as condições de fermentação adotadas;
- Avaliar a produção sequencial de hidrogênio e metano por fermentação utilizando HSA como fonte de carbono.

REFERÊNCIAS

ABDIN, Z., ZAFARANLOO, A., RAFIEE, A., *et al.* "Hydrogen as an energy vector", **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 120, n. December 2019, 2020. DOI: 10.1016/j.rser.2019.109620.

AKIL, K., JAYANTHI, S. "Anaerobic sequencing batch reactors and its influencing factors: an overview.", **Journal of environmental science & engineering**, v. 54, n. 2, p. 317–322, 2012.

ALEXANDROPOULOU, M., ANTONOPOULOU, G., LYBERATOS, G. "Food Industry Waste's Exploitation via Anaerobic Digestion and Fermentative Hydrogen Production in an Up-Flow Column Reactor", **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 4, p. 711–723, 2016. DOI: 10.1007/s12649-016-9544-y.

ALIBARDI, L., COSSU, R. "Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products", **Waste Management**, v. 47, p. 69–77, 2016. DOI: 10.1016/j.wasman.2015.07.049. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049>.

APHA, AWWA, WPCF. **APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, American Public Health Association. [S.l: s.n.], 2005.

AVILAN, L., ROUMEZI, B., RISOUL, V., *et al.* "Phototrophic hydrogen production from a clostridial [FeFe] hydrogenase expressed in the heterocysts of the cyanobacterium Nostoc PCC 7120", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5775–5783, 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-8989-2.

BALTZ, A., DANG, K. Van, BEYLY, A., *et al.* "Plastidial expression of type II NAD(P)H dehydrogenase increases the reducing state of plastoquinones and hydrogen photoproduction rate by the indirect pathway in chlamydomonas reinhardtii", **Plant Physiology**, v. 165, n. 3, p. 1344–1352, 2014. DOI: 10.1104/pp.114.240432.

BARAHONA, E., JIMÉNEZ-VICENTE, E., RUBIO, L. M. "Hydrogen overproducing nitrogenases obtained by random mutagenesis and high-throughput screening", **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1038/srep38291. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep38291>.

BASSANI, I., KOUGIAS, P. G., ANGELIDAKI, I. "In-situ biogas upgrading in thermophilic granular UASB reactor: key factors affecting the hydrogen mass transfer rate", **Bioresource Technology**, v. 221, p. 485–491, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.09.083. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.083>.

BORISOV, M., DIMITROVA, N., SIMEONOV, I. "Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion with Hydrogen and Methane Production", **IFAC-PapersOnLine**, v. 49, n. 26, p. 231–238, 2016. DOI: 10.1016/j.ifacol.2016.12.131. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.12.131>.

BORSCHIVER, S., SILVA, A. L. R. da; **Technology Roadmap. Planejamento Estratégico Para Alinhar Mercado- Produto-Tecnologia**. 1a. ed. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2016.

CALUSINSKA, M., HAMILTON, C., MONSIEURS, P., *et al.* "Genome-wide transcriptional analysis suggests hydrogenase- and nitrogenase-mediated hydrogen production in *Clostridium butyricum* CWBI 1009", **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2015. DOI: 10.1186/s13068-015-0203-5.

CAPUTO, G., MAZZEI, D., SGROI, M. F. "Methane/hydrogen mixtures from concentrated solar energy: The METISOL project", **Green Energy and Technology**, v. 2015, p. 37–51, 2015.

ÇELIK, D., YILDIZ, M. "Investigation of hydrogen production methods in accordance with green chemistry principles", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 36, p. 23395–23401, 2017. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.03.104.

CHEN, H., LIU, J., CHANG, X., *et al.* "A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals", **Fuel Processing Technology**, v. 160, p. 196–206, 2017. DOI: 10.1016/j.fuproc.2016.12.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>.

CHENG, J., DING, L., XIA, A., *et al.* "Hydrogen production using amino acids obtained by protein degradation in waste biomass by combined dark- and photo-fermentation", **Bioresource Technology**, v. 179, p. 13–19, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.109. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.109>.

CHERNICHARO, C. A. de L. **Anaerobic Reactors**. [S.l: s.n.], 2007. v. 6.

CHORUKOVA, E., SIMEONOV, I. "Mathematical modeling of the anaerobic digestion in two-stage system with production of hydrogen and methane including three intermediate products", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 20, p. 11550–11558, 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.01.228. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.228>.

CHOWDHARY, N., SELVARAJ, A., KUMAAR, L. K., *et al.* "Genome wide re-annotation of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* with new insights into genes involved in biomass degradation and hydrogen production", **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0133183.

CHUNG, Y., HONG, S., KIM, J. "Which of the technologies for producing hydrogen is the most prospective in Korea?: Evaluating the competitive priority of those in near-, mid-, and long-term", **Energy Policy**, v. 65, p. 115–125, 2014. DOI: 10.1016/j.enpol.2013.10.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2013.10.020>.

CONAB. "Açaí (fruto)", 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-acai>.

COSTA, A. G. V., GARCIA-DIAZ, D. F., JIMENEZ, P., *et al.* "Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries", **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 539–549, 2013. DOI: 10.1016/j.jff.2013.01.029.

DAWOOD, F., ANDA, M., SHAFIULLAH, G. M. "Hydrogen production for energy: An overview", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 7, p. 3847–3869, 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.12.059.

DE SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos, CAMMAROTA, M. C., DE OLIVEIRA, T. C., *et al.* "Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 7, p. 2986–2997, 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.12.103.

ELBESHISHY, E., DHAR, B. R., NAKHLA, G., *et al.* "A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation", **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 656–668, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.075. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>.

ELKAHLOUT, K., ALIPOUR, S., EROGLU, I., *et al.* "Long-term biological hydrogen production by agar immobilized Rhodobacter capsulatus in a sequential batch photobioreactor", **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 4, p. 589–599, 2017. DOI: 10.1007/s00449-016-1723-5.

ELKAHLOUT, K., SAGIR, E., ALIPOUR, S., *et al.* "Long-term stable hydrogen production from acetate using immobilized Rhodobacter capsulatus in a panel photobioreactor", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 34, p. 18801–18810, 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.10.133. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.133>.

EMBRAPA. "Cultivo do Açaizeiro (Euterpe oleracea Martius) no Noroeste do Brasil", **Sistemas de Produção** 36, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189148/1/Sistema-de-producao-Acai-2018.pdf>.

FARIA, A. A. A. **Fermentação metanogênica mesofílica de melaço e termofílica de vinhaça em reatores UASB**. 2014. 59 p. f. 2014.

FONSECA, B. C. **Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de Clostridium beijerinckii**. 2016. 107 f. 2016.

FUESS, L. T. **Biodigestão anaeróbia termofílica de vinhaça em sistemas combinados do tipo acidogênico-metanogênico para potencialização da recuperação de bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira geração**. 2017. 346 f. 2017.

GIL, M. V., ÁLVAREZ-GUTIÉRREZ, N., MARTÍNEZ, M., *et al.* "Carbon adsorbents for CO₂ capture from bio-hydrogen and biogas streams: Breakthrough adsorption study", **Chemical Engineering Journal**, v. 269, p. 148–158, 2015. DOI: 10.1016/j.cej.2015.01.100. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.01.100>.

GINOVSKA-PANGOVSKA, B., DUTTA, A., REBACK, M. L., *et al.* "Beyond the active site: The impact of the outer coordination sphere on electrocatalysts for hydrogen production and oxidation", **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 8, p. 2621–2630, 2014. DOI: 10.1021/ar5001742.

GOKFILIZ, P., KARAPINAR, I. "The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 4, p. 2553–2561, 2017. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.03.041. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.041>.

GOTTARDO, M., MICOLUCCI, F., MATTIOLI, A., *et al.* "Hydrogen and methane production from biowaste and sewage sludge by two phases anaerobic codigestion", **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 379–384, 2015. DOI: 10.3303/CET1543064.

HERCULANO, F. E. B. **Produção industrial de cosméticos: o protagonismo da biodiversidade vegetal da amazônia**. 2013. 144 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM, 2013.

HOSSEINI, S. S., AGHBASHLO, M., TABATABAEI, M., *et al.* "Thermodynamic evaluation of a photobioreactor for hydrogen production from syngas via a locally isolated *Rhodospseudomonas palustris* PT", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 41, p. 14246–14256, 2015. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.08.092. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.092>.

IBGE, I. B. de G. e E. "Produção Agrícola Municipal 2018", **IBGE, Produção Agrícola Municipal 2018.**, v. 45, p. 1–8, 2018. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2018_v45_br_informativo.pdf.

IBGE, I. B. de G. e E. "Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2018", **IBGE, Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2018**, v. 33, p. 1–8, 2019.

JÖNSSON, L. J., MARTÍN, C. "Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects", **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009.

KIM, J., LEE, H. J., HUH, S. Y., *et al.* "Households' willingness to pay for developing marine bio-hydrogen technology: The case of South Korea", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 26, p. 12907–12917, 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.03.202. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.202>.

KUCHARSKA, K., RYBARCZYK, P., HOŁOWACZ, I., *et al.* "Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes", **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 1–32, 2018. DOI: 10.3390/molecules23112937.

LAPA, K. R. **Avaliação de desempenho do reator anaeróbico em batelada seqüencial (ASBR), contendo biomassa imobilizada em pedra POME, para tratamento de**

esgoto sanitário. 2003.

LASSMANN, T., MILTNER, M., HARASEK, M., *et al.* "The purification of fermentatively produced hydrogen using membrane technology: A simulation based on small-scale pilot plant results", **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 18, n. 1, p. 315–322, 2016. DOI: 10.1007/s10098-015-0997-7.

LAZARO, C. Z., BOSIO, M., FERREIRA, J. dos S., *et al.* "The Biological Hydrogen Production Potential of Agroindustrial Residues", **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 3, p. 273–280, 2015. DOI: 10.1007/s12649-015-9353-8.

LEITÃO, G. C. S. **Produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia utilizando o hidrolisado da semente de açaí**. 2018. 112 f. 2018. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/186602/PPAU0156-D.pdf?sequence=1&isAllowed=y><http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127><http://www.scielo.br/pdf/rae/v45n1/v45n1a08><http://dx.doi.org/10.1016/j>.

MALAGÓN-ROMERO, D. H., LADINO, A., ORTIZ, N., *et al.* "Characterization of a polymeric membrane for the separation of hydrogen in a mixture with CO₂", **Open Fuels and Energy Science Journal**, v. 9, p. 126–136, 2016.

MAO, C., FENG, Y., WANG, X., *et al.* "Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion", **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540–555, 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.02.032. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>.

MASWANNA, T., PHUNPRUCH, S., LINDBLAD, P., *et al.* "Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 grown under anaerobic condition", **Biomass and Bioenergy**, v. 111, n. September 2017, p. 88–95, 2018. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.01.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.01.005>.

MONTEIRO, Alvaro Ferreira, MIGUEZ, I. S., SILVA, J. P. R. B., *et al.* "High concentration and yield production of mannose from açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis", **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-47401-3.

MONTI, M., SCOMA, A., MARTINEZ, G., *et al.* "Uncoupled hydrogen and volatile fatty acids generation in a two-step biotechnological anaerobic process fed with actual site wastewater", **New Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 341–346, 2015. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.08.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.08.002>.

NOGUEIRA, A. K. M., DE SANTANA, A. C., GARCIA, W. S. "A dinâmica do mercado de açaí fruto no Estado do Pará: De 1994 a 2009", **Revista Ceres**, v. 60, n. 3, p. 324–331, 2013. DOI: 10.1590/S0034-737X2013000300004. .

NOGUEIRA, O. L. ; FIGUEIRÊDO, F. J. C. ; MÜLLER, A. A. ; "Acai Production

Systems.", **Embrapa Amazonia Oriental - Production Systems.**, v. 4, p. 137, 2005. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/408196/1/SISTEMAPROD4ONLINE.pdf>.

OLIVEIRA, M. do S. P. de, NETO, J. T. de F., PENA, R. da S. "Açaí: técnicas de cultivo e processamento", **Instituto Frutal**, p. 104 p., 2007. Disponível em: http://ag20.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Cursoacai_Frutal_2007_000gbz4ubex02wx5ok01dx9lc36pq0js.pdf.

ORTEGA-RAMOS, M., JITTAWUTTIPOKA, T., SAENKHAM, P., *et al.* "Engineering synechocystis PCC6803 for hydrogen production: Influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses", **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–13, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0089372.

PAGLIACCIA, P., GALLIPOLI, A., GIANICO, A., *et al.* "Single stage anaerobic bioconversion of food waste in mono and co-digestion with olive husks: Impact of thermal pretreatment on hydrogen and methane production", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 2, p. 905–915, 2016. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.10.061. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.061>.

PATEL, S. K. S., LEE, J. K., KALIA, V. C. "Dark-Fermentative Biological Hydrogen Production from Mixed Biowastes Using Defined Mixed Cultures", **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 171–176, 2017. DOI: 10.1007/s12088-017-0643-7.

PESSOA, J. D. C., ARDUIN, M., MARTINS, M. A., *et al.* "Characterization of Açaí (*E. oleracea*) fruits and its processing residues", **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1451–1460, 2010. DOI: 10.1590/S1516-89132010000600022.

POMPEU, D. R., SILVA, E. M., ROGEZ, H. "Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology", **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6076–6082, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.03.083. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.083>.

ROMÃO, B. B., SILVA, F. T. M., COSTA, H. C. de B. C., *et al.* "Influence of Heat Pre-Treated Inoculum and pH Control on the Hydrogen Production by Microbial Consortium", **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 37, p. 505–512, 2018. DOI: 10.1002/ep.

RUGGERI, B., TOMMASI, T., SANFILIPPO, S. "Pretreatment to Increase Hydrogen Producing Bacteria", **Green Energy and Technology**, p. 25–36, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4471-6431-9.

SÁ, Lívian R. Vasconcelos de, CAMMAROTA, M. C., FERREIRA-LEITÃO, V. S. "Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – Aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros", **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857–867, 2014.

SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos de, CAMMAROTA, M. C., DE OLIVEIRA, T. C., *et*

al. "Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 7, p. 2986–2997, 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.12.103.

SADLER, N. C., BERNSTEIN, H. C., MELNICKI, M. R., *et al.* "Dinitrogenase-driven photobiological hydrogen production combats oxidative stress in *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 24, p. 7227–7235, 2016. DOI: 10.1128/AEM.02098-16.

SANTANA, R. de. **Montagem de Biorreator para Produção de Biogás em Batelada Monografia em Engenharia Química**. 2019.

SANTOS, S. C. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico**. 2014. 142 f.

SAZALI, N. "Emerging technologies by hydrogen: A review", **International Journal of Hydrogen Energy**, n. xxxx, 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2020.05.021. .

SEDAP. "Programa de Desenvolvimento da Cadeia Produtiva do Açaí no Estado do Pará - PROAÇAÍ – PA", 2018.

SEOL, E., SEKAR, B. S., RAJ, S. M., *et al.* "Co-production of hydrogen and ethanol from glucose by modification of glycolytic pathways in *Escherichia coli* - from Embden-Meyerhof-Parnas pathway to pentose phosphate pathway", **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 2, p. 249–256, 2016. DOI: 10.1002/biot.201400829.

SOMMER, D. J., VAUGHN, M. D., CLARK, B. C., *et al.* "Reengineering *cyt b562* for hydrogen production: A facile route to artificial hydrogenases", **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1857, n. 5, p. 598–603, 2016. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.09.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.09.001>.

STAZI, V., TOMEI, M. C. "Enhancing anaerobic treatment of domestic wastewater: State of the art, innovative technologies and future perspectives", **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 78–91, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.071.

VALENTE, A., IRIBARREN, D., DUFOUR, J. "Harmonised life-cycle global warming impact of renewable hydrogen", **Journal of Cleaner Production**, v. 149, p. 762–772, 2017. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.02.163. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.163>.

WALTER, S., KOCK, A., STEINHOFF, T., *et al.* "Isotopic evidence for biogenic molecular hydrogen production in the Atlantic Ocean", **Biogeosciences**, v. 13, n. 1, p. 323–340, 2016. DOI: 10.5194/bg-13-323-2016.

WANG, J., YIN, Y. "Progress in microbiology for fermentative hydrogen production from organic wastes", **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 10, p. 825–865, 2019. DOI: 10.1080/10643389.2018.1487226. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1487226>.

WERKNEH, A. A., RENE, E. R. "Applications of Nanotechnology and Biotechnology

for Sustainable Water and Wastewater Treatment", n. January, p. 405–430, 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-3259-3_19.

WONG, Y. M., WU, T. Y., JUAN, J. C. "A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation", **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471–482, 2014. DOI: 10.1016/j.rser.2014.03.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>.

YAMAGUCHI, K. K. D. L., PEREIRA, L. F. R., LAMARÃO, C. V., *et al.* "Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review", **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.055. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055>.

ZHANG, C., WANG, B., WANG, W., *et al.* "Characteristics of continuous hydrogen production within groove-type flat panel photo-biological reactor", **Nongye Jixie Xuebao/Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**, v. 47, n. 2, p. 208–214, 2016.

ZHANG, Chuan, MA, S., WANG, G., *et al.* "Enhancing continuous hydrogen production by photosynthetic bacterial biofilm formation within an alveolar panel photobioreactor", **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 50, p. 27248–27258, 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.08.183. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.183>.

ZHAO, L., CAO, G. L., SHENG, T., *et al.* "Bio-immobilization of dark fermentative bacteria for enhancing continuous hydrogen production from cornstalk hydrolysate", **Bioresource Technology**, v. 243, p. 548–555, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.161. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.161>.

ZHAO, Y., ZHU, J., JIA, X., *et al.* "Effect of hydrothermal pretreatment for kitchen waste liquid on anaerobic fermentation hydrogen production", **Chinese Journal of Environmental Engineering**, v. 10, n. 5, p. 2609–2615, 2016. DOI: 10.12030/j.cjee.201412241. .